

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7532371号
(P7532371)

(45)発行日 令和6年8月13日(2024.8.13)

(24)登録日 令和6年8月2日(2024.8.2)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 D 403/12 (2006.01)

C 0 7 D 403/12

C S P

A 6 1 K 31/53 (2006.01)

A 6 1 K 31/53

A 6 1 P 3/04 (2006.01)

A 6 1 P 3/04

A 6 1 P 3/06 (2006.01)

A 6 1 P 3/06

A 6 1 P 3/10 (2006.01)

A 6 1 P 3/10

請求項の数 16 (全43頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2021-533640(P2021-533640)

(86)(22)出願日 令和1年12月12日(2019.12.12)

(65)公表番号 特表2022-512482(P2022-512482
A)

(43)公表日 令和4年2月4日(2022.2.4)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/066013

(87)国際公開番号 WO2020/123827

(87)国際公開日 令和2年6月18日(2020.6.18)

審査請求日 令和4年12月8日(2022.12.8)

(31)優先権主張番号 201811527414.4

(32)優先日 平成30年12月13日(2018.12.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者 521076605

ターンズ・インコーポレイテッド

T E R N S , I N C .

アメリカ合衆国94404カリフォルニ

ア州フォスター・シティ、イースト・ヒ

ルズデイル・ブルバード1065番、

スイート100

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100150500

弁理士 森本 靖

(72)発明者 ユー, シャンハイ

アメリカ合衆国94404カリフォルニ

ア州フォスター・シティ、イースト・ヒ

ルズデイル・ブルバード1065、ス

最終頁に続く

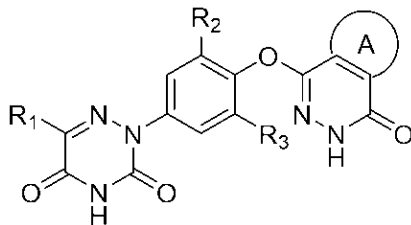
(54)【発明の名称】 T H R 受容体アゴニスト化合物、およびその製造方法および使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記の式(I)：

【化1】



(I)

[式中、

R₁は、水素、シアノ、置換または非置換のC₁-6アルキル、または、置換または非置換のC₃-6シクロアルキルからなる群から選択され、該置換基は、ハロゲン原子、ヒドロキシ、およびC₁-6アルコキシからなる群から選択され、；

R₂およびR₃は、それぞれ独立して、ハロゲン原子、または、置換または非置換のC₁-6アルキルからなる群から選択され、該置換基は、ハロゲン原子、ヒドロキシ、およびC₁-6アルコキシからなる群から選択され；

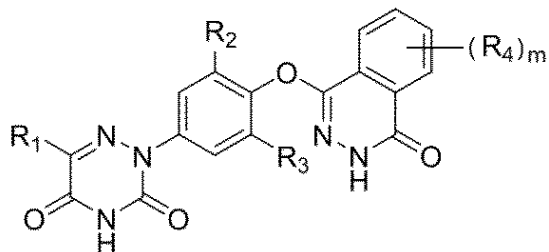
環Aは、置換または非置換のC₆-10芳香族炭素環であり、該置換基は、水素、ハロゲ

ン原子、ヒドロキシ、 $-OCF_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC_{1-4}$ アルキル、 $-N(C_{1-4}$ アルキル) $_2$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CONHC_{1-4}$ アルキル、 $-CON(C_{1-4}$ アルキル) $_2$ 、 $-NHCOOC_{1-4}$ アルキル、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、または、 C_{3-6} シクロアルキルからなる群から選択される1つ以上の基であり；および、ハロゲン原子は、F、Cl、またはBrからなる群から選択される。]で表される化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項2】

下記の式(III)：

【化2】



10

[式中、

R_1 から R_3 は、請求項1で定義されたとおりであり；

R_4 は、水素、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 $-OCF_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC_{1-4}$ アルキル、 $-N(C_{1-4}$ アルキル) $_2$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CONHC_{1-4}$ アルキル、 $-CON(C_{1-4}$ アルキル) $_2$ 、 $-NHCOOC_{1-4}$ アルキル、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、または C_{3-6} シクロアルキルからなる群から選択され；

20

m は、1～4の範囲の整数であり；および、

ハロゲン原子は、F、Cl、またはBrからなる群から選択される。]

で表される構造で示される化合物である、請求項1に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項3】

R_4 が、水素、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 $-OCF_3$ 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、または C_{3-6} シクロアルキルからなる群から選択され；および、

30

m が、1～3の範囲の整数である、

請求項2に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項4】

R_4 が、水素、ハロゲン原子、または C_{1-3} アルキルからなる群から選択され；および、 m が、1、または2である、請求項3に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項5】

R_1 が、水素、シアノ、および、置換または非置換の C_{1-6} アルキルからなる群から選択され、該置換基は、ハロゲン原子、ヒドロキシ、および C_{1-6} アルコキシからなる群から選択され；および、

40

ハロゲン原子が、F、Cl、またはBrからなる群から選択される、

請求項1～4のいずれか1項に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項6】

R_1 が、シアノ、または C_{1-3} アルキルからなる群から選択される、請求項5に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項7】

R_1 が、シアノである、請求項6に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項8】

R_2 および R_3 が、それぞれ独立して、F、Cl、またはBrからなる群から選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

50

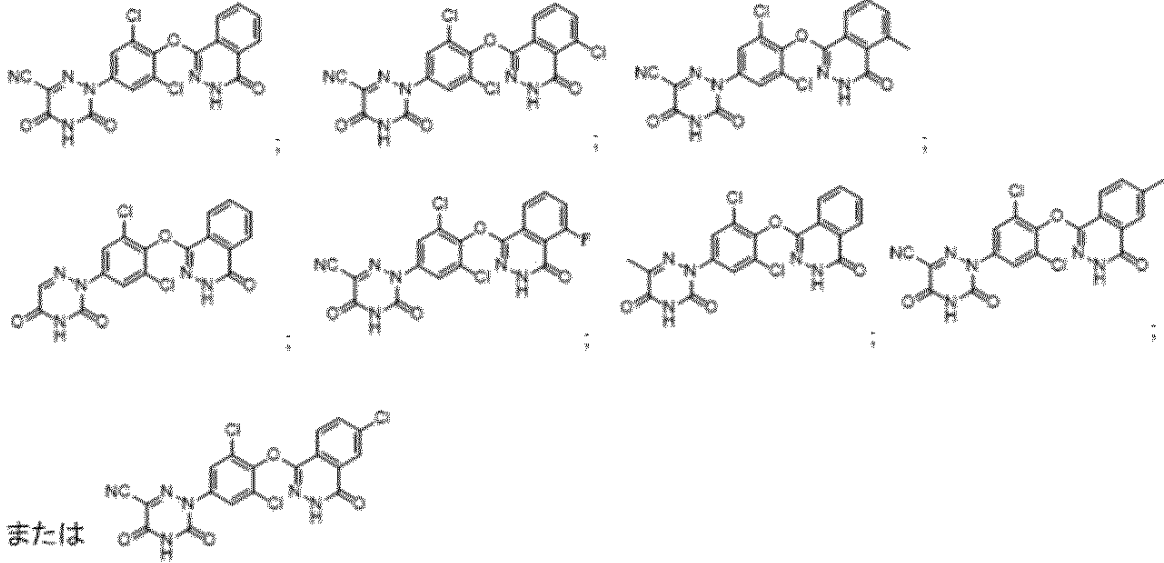
【請求項 9】

R₂ および R₃ が、ともに、C1 である、請求項 8 に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 10】

化合物またはその薬学的に許容される塩が、下記の化合物：

【化 3】



のいずれかの 1 つである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 11】

代謝関連疾患の治療薬の製造における、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩の使用。

【請求項 12】

代謝関連疾患が、肥満、高脂血症、高コレステロール血症、糖尿病、および、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、脂肪肝、アテローム性動脈硬化症、甲状腺機能低下症、および甲状腺癌からなる群から選択される、請求項 11 に記載の使用。

【請求項 13】

代謝関連疾患が、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、甲状腺機能低下症、および甲状腺癌からなる群から選択される、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

治療有効量の請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の化合物または薬学的に許容される塩、および、薬学的に許容される補助剤を含む、代謝関連疾患の治療のための医薬組成物。

【請求項 15】

代謝関連疾患が、肥満、高脂血症、高コレステロール血症、糖尿病、および、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、脂肪肝、アテローム性動脈硬化症、甲状腺機能低下症、および甲状腺癌からなる群から選択される、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

代謝関連疾患が、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、甲状腺機能低下症、および甲状腺癌からなる群から選択される、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2018年12月13日に提出された中国特許出願第20181152741

10

20

30

40

50

4. 4号の優先権を主張し、その開示は、全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

技術分野

本発明は、医薬合成の分野、特に、THR 受容体の新規アゴニストとして機能し得る化合物、およびその製造方法および使用に関する。

【背景技術】

【0003】

甲状腺ホルモン (TH) は、下垂体によって分泌される甲状腺刺激ホルモン (TSH) に応答して甲状腺で合成される。チロキシンは、体の成長、発達、代謝、および体のバランスを調節する上でかなり重要な役割を果たす。甲状腺ホルモンは、主に、3, 5, 3'-トリヨード-L-チロキシン (T3) とチロキシン (T4) の2つの種類がある。ヒトの体は主にT4を分泌する。末梢器官では、T4はデヨージナーゼ (脱ヨウ素酵素) によってより大きな活性を持つT3に変換される。甲状腺によって生成されるT3およびT4は、負のフィードバック制御下にある。甲状腺刺激ホルモン (TSH) は、正常な甲状腺機能と甲状腺ホルモン分泌に関与している。甲状腺刺激ホルモンは下垂体前葉で合成され、その分泌は視床下部で合成される甲状腺放出ホルモン (TRH) によって制御される。

10

【0004】

甲状腺ホルモンは、甲状腺ホルモン受容体 (THR) に結合することによって機能する。甲状腺ホルモン受容体は、核内受容体のファミリーに属し、標的遺伝子の発現を調節する。甲状腺ホルモン受容体には、THR とTHR の2つの異なるサブタイプが含まれる。THR は主に心臓組織に分布しており、心臓機能の調節に重要な役割を果たしている。THR サブタイプは主に肝臓と下垂体で発現し、コレステロール代謝と甲状腺刺激ホルモン分泌を調節する。

20

【0005】

正常レベルでは、甲状腺ホルモンTHは、体重、代謝率、体温、および感情を維持し、血清コレステロールの調節に関与している。血清コレステロールを調節するために甲状腺ホルモンを使用する試みがなされている。しかしながら、天然の甲状腺ホルモンの摂取による心臓への潜在的な副作用 (頻脈や不整脈、心不全、甲状腺軸機能、筋肉代謝、骨粗鬆症など) を考慮すると、甲状腺ホルモンは、高コレステロールや肥満の治療には適していない。THR 遺伝子の選択的ノックアウトを有する動物の研究に関する研究結果、およびいくつかの選択的THRリガンドの研究結果は、これらの甲状腺ホルモンによって引き起こされる心臓への副作用がTHR に起因する可能性があることを示している。

30

【0006】

甲状腺ホルモン受容体の経路は、コレステロール、トリグリセリド、およびリポタンパク質を含む脂質の代謝を調節する。低密度コレステロールを下げると心血管疾患の発生率を下げるができることが臨床的に示されている。

【0007】

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はまた、肝臓におけるトリグリセリドの過剰な蓄積によって引き起こされる一種の代謝性障害疾患であり、これはさらに肝細胞の損傷および炎症を引き起こし、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) をもたらす可能性がある。NASH患者は、通常、NASHとともに、2型糖尿病、高コレステロール、高脂血症、および肥満を有している。さらに、それらは、肝硬変、肝不全、そして最終的には肝臓癌を発症する可能性が高い。当該分野では、現在、NASHを効果的に治療する薬は限られている。脂質代謝を調節する甲状腺ホルモンの機能を考慮すると、甲状腺受容体経路は、NASHおよびNAFLDの治療の潜在的な標的になる。甲状腺ホルモン類似体は、動物の肝臓の脂肪レベルを大幅に低下させることができることが動物の体で証明されている。

40

【0008】

選択的THR アゴニストを使用して、従来のTHR受容体アゴニストから生じる心臓

50

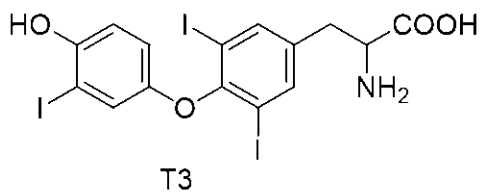
への副作用を回避し、T H R のみを選択的に活性化することにより、細胞脂質代謝を改善し、コレステロールおよび血中脂肪を低下させる機能をもたらすことができる。しかしながら、選択的T H R アゴニストは、甲状腺軸も阻害し、うつ病、倦怠感、骨粗鬆症、およびその他の副作用を引き起こす可能性がある。したがって、甲状腺軸阻害に伴う副作用を回避するために、T H R を活性化するとともに甲状腺軸の阻害を低減する選択的T H R アゴニストを開発することが望まれている。

【0009】

WO03094845、WO2007009913、WO2010122980、およびWO2011038207などの特許は、いくつかのT H R 受容体アゴニストを開示している。これらのアゴニストの構造は、ほとんどすべて、T H R 受容体の天然リガンドT 3に基づいて設計および開発されている。このような背景に基づいて、甲状腺ホルモンの有益な治療効果を有するだけでなく、心臓に影響を与える副作用を回避する選択的T H R 受容体アゴニストを開発することが依然として望まれている。

10

【化1】



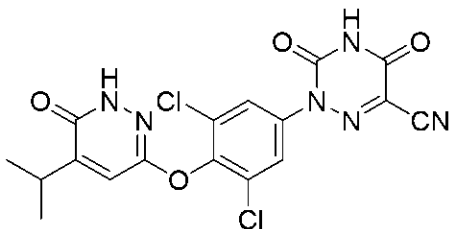
20

【0010】

構造修飾は、T H R 受容体の天然リガンドT 3に基づいて、また、本発明において実施される。本発明者らは、予想外に、ほとんどの修飾化合物がT H R 受容体に対して良好なアゴニスト活性を維持し、いくつかの化合物は、参考文献(「2-[3,5-ジクロロ-4-(5-イソプロピル-6-オキソ-1,6-ジヒドロピリダジン-3-イルオキシ)フェニル]-3,5-ジオキソ-2,3,4,5-テトラヒドロ[1,2,4]トリアジン-6-カルボニトリル(MGL-3196)の発見、脂質異常症の治療のための臨床試験における高選択性甲状腺ホルモン受容体アゴニスト」、Martha et al., Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 3912-3923)の比較化合物53と比較して、T H R に対する選択性も向上することを発見した。同時に、本発明のいくつかの化合物はまた、非常に望ましい薬物動態特性を示す。いくつかの好ましい化合物の薬物動態特性は、比較化合物のものよりも著しく優れており、したがって、最終の薬物の特性を向上する。

30

【化2】



40

比較化合物53

【発明の概要】

【0011】

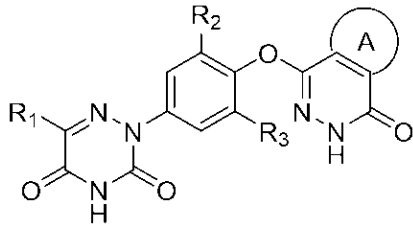
上記の技術的課題を解決するために、本発明は、以下の技術的解決手段を用いる。

【0012】

本発明の一態様によれば、本発明は、下記の式(I)：

50

【化3】



(I)

[式中、

R_1 は、水素、シアノ、置換または非置換の C_{1-6} アルキル、または、置換または非置換の C_{3-6} シクロアルキルからなる群から選択され、該置換基は、ハロゲン原子、ヒドロキシ、および C_{1-6} アルコキシからなる群から選択され、；

R_2 および R_3 は、それぞれ独立して、ハロゲン原子、または、置換または非置換の C_{1-6} アルキルからなる群から選択され、該置換基は、ハロゲン原子、ヒドロキシ、および、 C_{1-6} アルコキシからなる群から選択され；

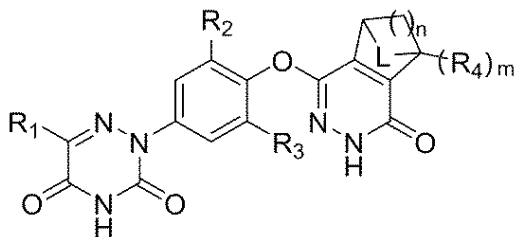
環 A は、置換または非置換の飽和または不飽和の C_{5-10} 脂肪族環、または、置換または非置換の C_{5-10} 芳香族環であり、該置換基は、水素、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 $-OCF_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC_{1-4}$ アルキル、 $-N(C_{1-4}$ アルキル) $_2$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CONHC_{1-4}$ アルキル、 $-CON(C_{1-4}$ アルキル) $_2$ 、 $-NHCOC_{1-4}$ アルキル、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、または、 C_{3-6} シクロアルキルからなる群から選択される1つ以上の基であり、そして、2つの置換基が含まれる場合、その2つの置換基は、それらが結合する炭素と一緒に環構造を形成してもよく；および、ハロゲン原子は、F、Cl、またはBrからなる群から選択される。]

で表される化合物、およびその薬学的に許容される塩、を提供する。

【0013】

本発明による化合物は、下記の式(II)：

【化4】



(II)

[式中、

R_1 から R_3 は、上記の式(I)で定義されたとおりであり；

L は、存在しないか、または、 $-CH_2-$ 、および $-CH_2CH_2-$ からなる群から選択され；

R_4 は、水素、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 $-OCF_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC_{1-4}$ アルキル、 $-N(C_{1-4}$ アルキル) $_2$ 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、または C_{3-6} シクロアルキルからなる群から選択され；

n は、1 ~ 4 の範囲の整数であり；

m は、1 ~ 4 の範囲の整数であり；

L が存在しない場合、該環は、2つ以上の置換基 R_4 を有していてもよく；および、ハロゲン原子は、F、Cl、またはBrからなる群から選択される。]

で表される構造で示される化合物である。

【0014】

10

20

30

40

50

好ましくは、式 (I I) で表される構造において、 R_4 が、水素、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 C_{1-3} アルキル、 C_{1-3} アルコキシ、または C_{3-6} シクロアルキルからなる群から選択され；

L が、存在しないか、または、 $-CH_2-$ 、または $-CH_2CH_2-$ からなる群から選択され；

n が、1、2、または3であり；および、

m が、1、または2である。

【0015】

さらに好ましくは、式 (I I) で表される構造において、 R_4 が、水素、または C_{1-3} アルキルからなる群から選択され；

L が、 $-CH_2-$ 、または $-CH_2CH_2-$ からなる群から選択され；

n が、1、2、または3であり；および、

m が、1、または2である。

【0016】

さらに好ましくは、式 (I I) で表される構造において、 R_4 が、水素、または C_{1-3} アルキルからなる群から選択され；

L が、存在せず；

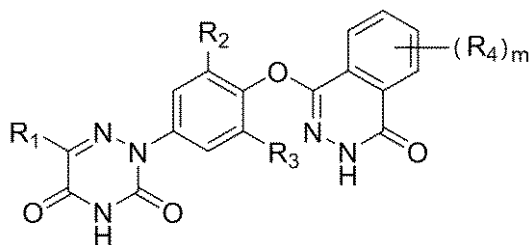
n が、1、2、または3であり；および、

m が、1、または2である。

【0017】

本発明による化合物は、下記の式 (I I I) ；

【化5】



[式中、

R_1 から R_3 は、上記の式 (I) で定義されたとおりであり；

R_4 は、水素、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 $-OCF_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NHC_{1-4}$ アルキル、 $-N(C_{1-4}$ アルキル) $_2$ 、 $-CONH_2$ 、 $-CONHC_{1-4}$ アルキル、 $-CON(C_{1-4}$ アルキル) $_2$ 、 $-NHCO C_{1-4}$ アルキル、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、または C_{3-6} シクロアルキルからなる群から選択され；

m は、1 ~ 4 の範囲の整数であり；および、

ハロゲン原子は、 F 、 Cl 、または Br からなる群から選択される。]

で表される構造で示される化合物である。

【0018】

好ましくは、式 (I I I) で表される構造において、 R_4 が、水素、ハロゲン原子、ヒドロキシ、 $-OCF_3$ 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、または C_{3-6} シクロアルキルからなる群から選択され；および、 m が、1 ~ 3 の範囲の整数である。

【0019】

好ましくは、式 (I I I) で表される構造において、 R_4 が、水素、ハロゲン原子、または C_{1-3} アルキルからなる群から選択され；および、 m が、1、または2である。

【0020】

好ましくは、本発明による、式 (I)、式 (I I)、または式 (I I I) の構造で示される前記化合物において、 R_1 が、水素、シアノ、置換または非置換の C_{1-6} アルキルからなる群から選択され、さらに好ましくは、 R_1 が、シアノ、または C_{1-3} アルキルから

10

20

30

40

50

なる群から選択され、よりさらに好ましくは、 R_1 が、シアノである。

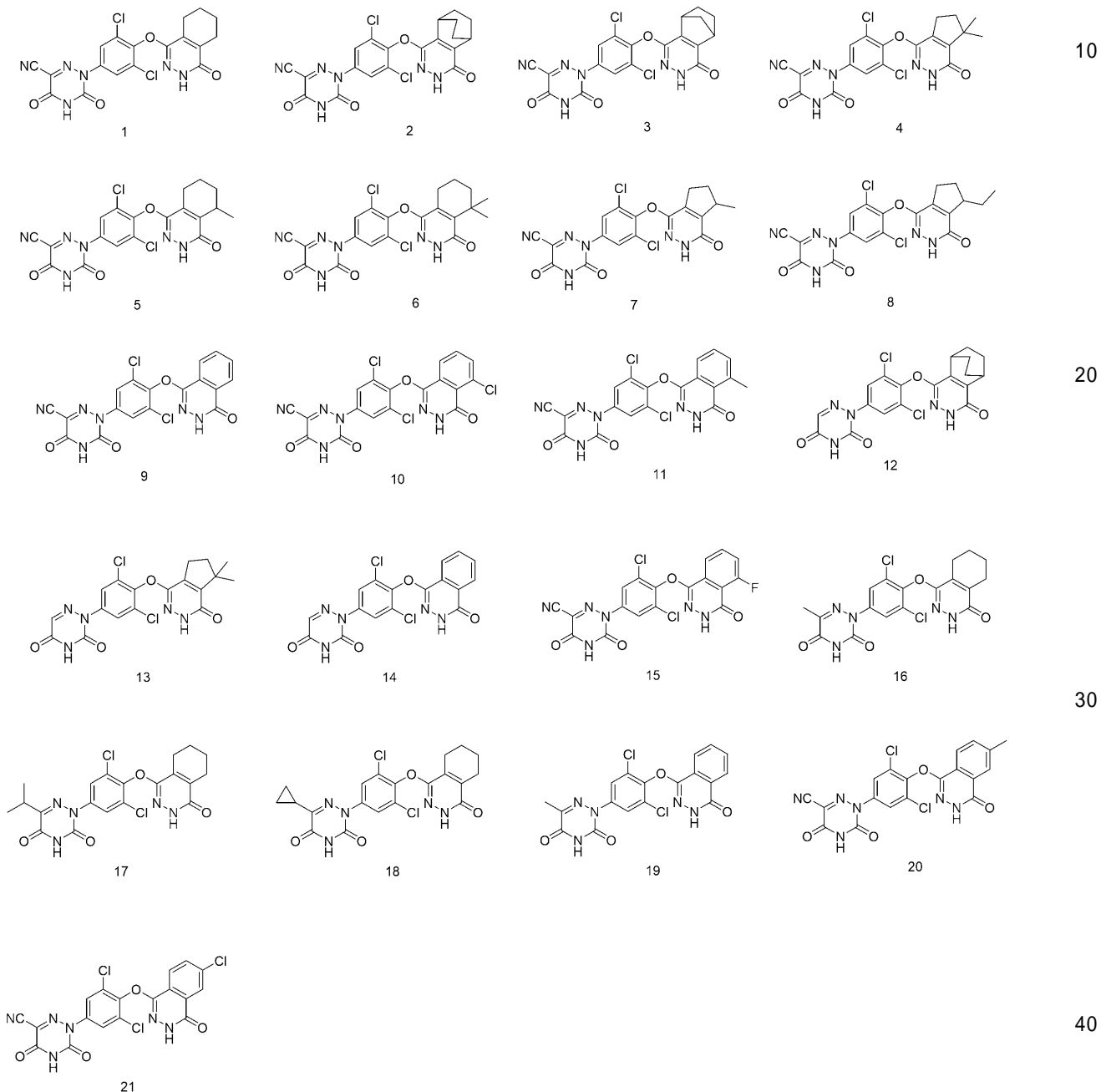
【0021】

好ましくは、本発明による、式(I)、式(II)、または式(III)の構造で示される前記化合物において、 R_2 および R_3 が、それぞれ独立して、F、Cl、またはBrからなる群から選択され、さらに好ましくは、 R_2 および R_3 が、ともに、Clである。

【0022】

好ましくは、化合物およびその薬学的に許容される塩が、下記の化合物：

【化6】

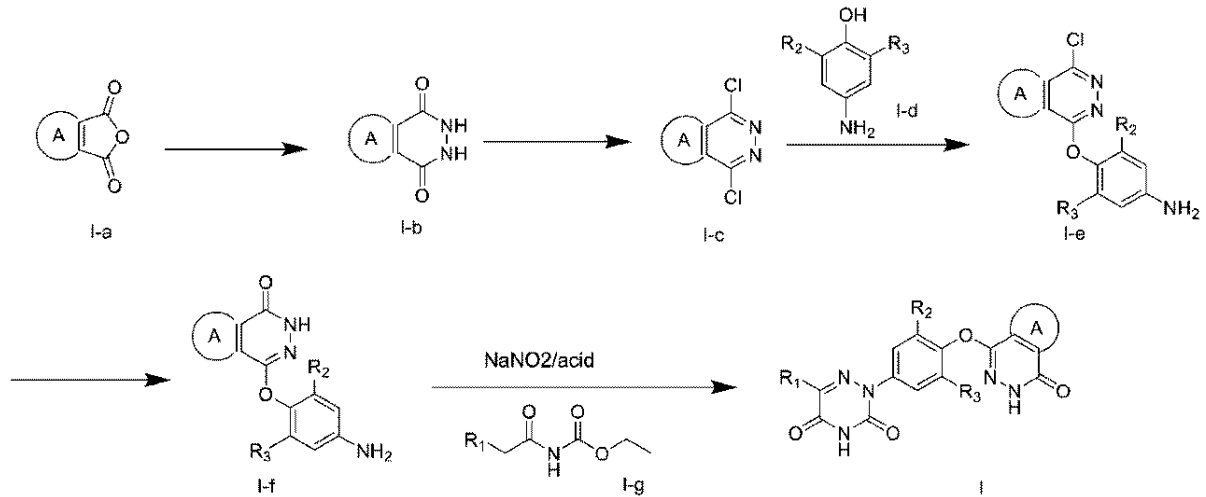


のいずれかの1つである。

【0023】

本発明の別の態様によれば、本発明は、該化合物の製造方法を提供し、製造方法は、下記の工程：

【化 7】



10

- 1) 分子内無水物の化合物 I - a をヒドラジン塩酸塩と反応させて、一般式 I - b の化合物を得る；
 - 2) 得られた一般式 I - b の化合物をオキシ塩化リン中で加熱して、一般式 I - c の化合物を形成する；
 - 3) 得られた一般式 I - c の化合物と化合物 I - d を高温でカップリング反応させて、一般式 I - e の化合物を得る（この条件において触媒はヨウ化第一銅であることが好ましい）；
 - 4) 得られた一般式 I - e の化合物を、酸性またはアルカリ性の高温で反応させて、一般式 I - f の化合物を得る；そして、
 - 5) 得られた一般式 I - f の化合物を酸性水溶液中で亜硝酸ナトリウムと反応させ、次いで、化合物 I - g を加えてさらに反応させ、高温で閉環させて、一般式 I の化合物を得る（この条件下では、酸は好ましくは塩酸である）；
- を含む。

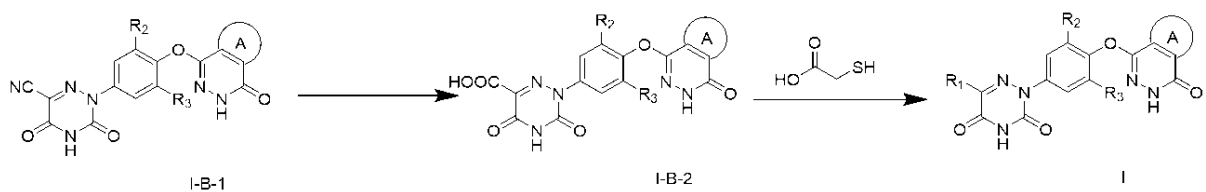
20

【 0 0 2 4 】

本発明による一般式 I の化合物は、下記：

30

【化 8】



のようにして製造されてもよい。

一般式 I - B - 1 の化合物を酸性水溶液中で高温加水分解して、一般式 I - B - 2 の化合物を得る（この条件下では、酸は好ましくは塩酸である）；そして、得られた一般式 I - B - 2 の化合物をメルカプト酢酸の存在下、高温で反応させてカルボキシを除去し、一般式 I の化合物を得る。

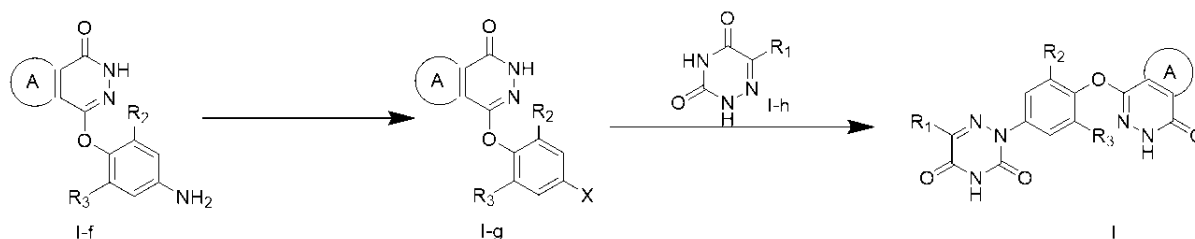
40

【 0 0 2 5 】

本発明による一般式 I の化合物は、下記の方法：

50

【化 9】



により製造されてもよい。

一般式 I - f の化合物を酸性条件下で亜硝酸ナトリウムと反応させてジアゾニウム塩化合物を形成し、次いで、ハロゲン化物アニオンを加えて、一般式 I - g の化合物を得る；そして、遷移金属触媒下で、得られた一般式 I - g の化合物を中間体 I - h とカップリングさせて、一般式 I の化合物を得る。

10

【0026】

本発明の別の態様によれば、本発明は、代謝関連疾患の治療薬の製造における、該化合物の使用、を提供する。

【0027】

本発明の別の態様によれば、本発明は、有効成分としての治療有効量の本発明の化合物および薬学的に許容される塩、および、薬学的に許容される補助剤を含む、医薬組成物、を提供する。

20

【0028】

好ましくは、代謝関連疾患は、肥満、高脂血症、高コレステロール血症、糖尿病、および、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、脂肪肝、アテローム性動脈硬化症、甲状腺機能低下症、および甲状腺癌からなる群から選択され、好ましくは、代謝関連疾患は、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、甲状腺機能低下症、および甲状腺癌からなる群から選択される。

【0029】

本発明の別の態様によれば、本発明は、有効量の本発明の化合物、または該化合物およびその薬学的に許容される塩を有効成分として含む医薬組成物を、対象に投与することを、対象に投与することを、提供する。

30

【0030】

好ましくは、代謝関連疾患の治療方法によれば、代謝関連疾患は、肥満、高脂血症、高コレステロール血症、糖尿病、および、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、脂肪肝、アテローム性動脈硬化症、甲状腺機能低下症、および甲状腺癌からなる群から選択され、好ましくは、代謝関連疾患は、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、甲状腺機能低下症、および甲状腺癌からなる群から選択される。

【発明を実施するための形態】

【0031】

本発明を以下に詳細に説明する。説明に先立って、本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される用語は、一般的な意味および辞書の意味に限定されると解釈されるものではなく、発明者が最良の解釈のために用語を適切に定義することが認められているという原則に基づいて本発明の技術的態様における対応する意味および概念に従って解釈されるべきであることを理解されるべきである。したがって、ここで提案する説明は、例示の目的のための好ましい例にすぎず、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。したがって、本発明の精神および範囲から逸脱しなければ、それから他の均等物または改良物を得ることができることを理解されたい。

40

【0032】

本発明によれば、本明細書で引用されるすべての用語は、特に断りのない限り、当業者が本発明を理解するものと同様の意味を有する。

【0033】

50

本明細書において、「塩」との用語は、陽イオンおよび陰イオンを含む化合物を意味し、これは、プロトンを受け入れることができる部位のプロトン化、および/またはプロトンを供給することができる部位のプロトン引き抜きによって、形成することができる。注目することに、プロトンを受け入れることができる部位のプロトン化は、カチオン性物質の形成を導き、その電荷は、生理学的陰イオンの存在によってバランスがとられるのに対し、プロトンを供給することができる部位のプロトン引き抜きは、陰イオン物質の形成を導き、その電荷は、生理学的陽イオンの存在によってバランスがとられる。

【0034】

「薬学的に許容される塩」との用語は、その塩が薬学的に許容されることを意味する。薬学的に許容される塩としては、例えば、これに限定されるものではないが、(1)無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、およびリン酸で形成されるか、または、有機酸、例えば、グリコール酸、ピルビン酸、乳酸、マロン酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、クエン酸、3-(4-ヒドロキシベンゾイル)安息香酸、ケイ皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、1,2-エタン-ジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、4-クロロベンゼンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、4-パラトルエンスルホン酸、カンファー酸、ドデシル硫酸、グルコン酸、グルタミン酸、サリチル酸、およびシス-ムコン酸で形成される、酸付加塩；または、(2)上記の無機酸の共役塩基で形成される、アルカリ付加塩が挙げられ、ここで、共役塩基は、 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、および $\text{NH}_x\text{R}_{4-x}^+$ からなる群から選択されるカチオン性成分を含み、ここで、 $\text{NH}_x\text{R}_{4-x}^+$ (Rは C_{1-4} アルキルであり、添字xは0、1、2、3または4からなる群から選択される整数である)は、第4級アンモニウム塩の陽イオンを表す。関与するすべての薬学的に許容される塩は、同じ酸付加塩について本明細書で定義される溶媒付加形態(溶媒和物)または結晶形態(多形物)を含むことが理解されるべきである。

【0035】

「 C_{1-M} アルキル」との用語は、1からM個の炭素原子を含むアルキルを意味し、ここで、Mは、以下の数値を有する整数である：2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30。例えば、「 C_{1-6} アルキル」とは、1~6個の炭素原子を含むアルキルを意味する。アルキルとしては、例えば、メチル、エチル、プロピル、i-プロピル、n-ブチル、i-ブチル、t-ブチル、またはアミル、i-アミル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、およびオクチルが挙げられるが、低級アルキルに限定されるものではない。

【0036】

「芳香族基」との用語は、芳香族系を意味し、これは、単環式環、または縮合または結合した環の少なくとも一部が共役芳香族系を形成するように元から一緒に縮合または結合した芳香族多環、であり得る。アリール基としては、これに限定するものではないが、フェニル、ナフチル、およびテトラリル(tetraaryl)が挙げられる。アリールは、任意に置換されてもよく、例えば、1~4個のアリール基またはヘテロ環が、ハロゲン、-CN、-OH、-NO₂、アミノ、アルキル、シクロアルキル、アルケニル、アルキニル、アルコキシ、アリーロキシ、置換アルコキシ、アルキルカルボニル、アルキルカルボキシ、アルキルアミノ、またはアリールチオからなる群から選択される基によって置換される。

【0037】

「置換」との用語は、参照する基が、1つまたは複数の追加の基で置換され得ることを意味し、ここで、追加の基は、アルキル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロ脂環式炭化水素、ヒドロキシ、アルコキシ、アルキルチオール、アリールチオ、アルキルスルフィニル、アリールスルフィニル、アルキルスルホニル、アリールスルホニル、シアノ、ハロ、カルボニル、チオカルボニル、ニトロ、ハロアルキル、フルオロアルキル、およびアミノ(一置換および二置換アミノ基およびそれらによって保護される誘導体

10

20

30

40

50

を含む) からなる群から、個別に独立して選択される。

【0038】

本発明により提供される式(I)で表される化合物またはその薬学的に許容される塩、および該化合物を含む医薬組成物は、例えば、錠剤、カプセル、粉末、シロップ、溶液、懸濁液、およびエアロゾルなどの様々な形態であり得、適切な固体または液体の担体または希釈剤の中で、および注射または注入に適した殺菌液の中で、存在し得る。

【0039】

本発明の医薬組成物の様々な剤形は、医薬の分野における従来の製造方法に従って製造することができる。例えば、製剤の単位用量は、0.05~200mgの式(I)の化合物またはその薬学的に許容される塩を含み、好ましくは、製剤の単位用量は、0.1~100mgの式(I)の化合物を含む。

10

【0040】

本発明により提供される一般式(I)で表される化合物または医薬組成物は、経口、経鼻、経皮、経肺、または胃腸管経路などの投与経路を通じて、ヒトおよび動物を含む哺乳動物において臨床的に使用することができる。経口投与が最も好ましい。最も好ましい1日量は、単回投与あたり0.01~200mg/kg体重であり、あるいは、分割した投与あたり0.01~100mg/kg体重である。投与方法にかかわらず、特定の治療法に基づいて、個体に最適な用量を決定すべきである。通常、投与は少量から始まり、最適な用量が見つかるまで徐々に増加させる。

【0041】

本発明において、「有効量」との用語は、期待される効果を達成するために必要とされる用量および期間のための有効量を意味し得る。この有効量は、病気の種類、治療時の病気の症状；投与される特定の標的器官の構造；患者の個々の身長および体重、または、病気または症状の重症度、などの特定の要因によってさまざまに異なるものとなり得る。当業者は、経験により、不必要な実験を行うことなく、特定の化合物の有効量を決定することができる。

20

【0042】

典型的な製剤は、本発明の一般式(I)で表される化合物と、担体、希釈剤または賦形剤とを混合することによって製造される。適切な担体、希釈剤または賦形剤は、当業者によく知られており、炭水化物、ワックス、水溶性および/または膨張性ポリマー、親水性または疎水性物質、ゼラチン、油、溶媒、および水などの物質が挙げられる。

30

【0043】

使用される特定の担体、希釈剤または賦形剤は、本発明の化合物の使用法および目的に従って決定されるものである。一般に、溶媒は、当業者により、哺乳動物に安全で有効に投与することができる溶媒に基づいて選択される。一般に、安全な溶媒は、水などの非毒性の水性溶媒、および水に可溶または水と混和性のある他の非毒性の溶媒である。適切な水性溶媒としては、水、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール(例えば、PEG400、およびPEG300)などの1つまたは複数挙げられる。製剤はまた、緩衝剤、安定剤、界面活性剤、湿潤剤、潤滑剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤、抗酸化剤、光遮蔽剤、流動助剤、加工助剤、着色剤、甘味料、香料、香味剤、または他の既知の添加剤の1つまたは複数を含んでもよく、それによって、薬物を許容可能な形態で製造または使用することができる。

40

【0044】

本発明の式(I)の化合物を少なくとも1つの他の薬物と組み合わせて使用する場合、2つ以上の薬物を別々にまたは組み合わせて、好ましくは医薬組成物の形態で、使用することができる。本発明の式(I)の化合物または医薬組成物は、既知の経口、静脈内、直腸、膺、経皮、他の局所または全身投与形態で、対象に別々にまたは一緒に投与することができる。

【0045】

これらの医薬組成物はまた、緩衝剤、安定剤、界面活性剤、湿潤剤、潤滑剤、乳化剤、

50

懸濁剤、保存剤、抗酸化剤、光遮蔽剤、流動助剤、加工助剤、着色剤、甘味料、香料、香味料、または他の既知の添加物の1つまたは複数を含んでもよく、それによって、医薬組成物を許容可能な形態で製造または使用することができる。

【0046】

本発明の薬物には、経口投与経路が好ましい。経口投与用の固体剤形としては、カプセル、錠剤、粉末、または粒子製剤を挙げることができる。固体剤形において、本発明の化合物または医薬組成物は、少なくとも1つの不活性な賦形剤、希釈剤または担体と混合される。適切な賦形剤、希釈剤または担体としては、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム、またはデンプン、ラクトース、スクロース、マンニトール、ケイ酸などの物質；カルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース、アラビアガムなどの粘着剤；グリセロールなどの湿潤剤；寒天、炭酸カルシウム、イモまたはキャッサバ澱粉、アルギン酸、特定の複合ケイ酸塩、および炭酸ナトリウムなどの崩壊剤；パラフィンなどの溶液ブロッキング剤；第四級アンモニウム化合物などの吸収促進剤；カオリンおよびベントナイトなどの吸着剤；および、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、およびラウリル硫酸ナトリウムなどの潤滑剤、などが挙げられる。カプセルおよび錠剤の場合、剤形はまた、緩衝液を含んでもよい。同様のタイプの固体組成物は、ラクトースおよび高分子量ポリエチレングリコールを賦形剤として使用する、ソフトおよびハード充填ゼラチンカプセルの充填剤として使用されてもよい。

10

【0047】

経口投与用の液体剤形としては、薬学的に許容されるエマルジョン、溶液、懸濁液、および、シロップおよびエリキシルが挙げられる。本発明の化合物またはその医薬組成物に加えて、液体剤形は、当技術分野で一般的に使用される不活性な希釈剤、例えば、水または他の溶媒；エタノール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブタンジオール、ジメチルホルムアミドなどの可溶化剤および乳化剤；油（例えば、綿実油、落花生油、トウモロコシ胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、およびゴマ油）；グリセロール；テトラヒドロフルフリルアルコール；ポリエチレングリコールとソルビタンの脂肪酸エステル；または、これらの物質のいくつかの混合物など、を含み得る。

20

【0048】

これらの不活性な希釈剤に加えて、組成物はまた、賦形剤、例えば、湿潤剤、乳化剤、懸濁剤、甘味料、香味剤、および香料などの1つまたは複数、を含んでもよい。

30

【0049】

懸濁液について、本発明の一般式(I)で表される化合物またはその薬学的に許容される塩またはそれを含む医薬組成物に加えて、懸濁液は、懸濁剤などの担体、例えば、エトキシ化イソステアロール、ポリオキシエチレンソルビトール、ソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、寒天およびトラガカントガム、またはこれらの物質のいくつかの混合物など、をさらに含み得る。

【0050】

本発明の一般式(I)で表される化合物またはその薬学的に許容される塩またはそれを含む医薬組成物は、軟膏、粉末、スプレー、および吸入剤を含む、他の局所剤形を用いて投与されてもよい。この薬物は、無菌条件下で、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤または担体、および必要に応じて任意の保存剤、緩衝剤または高圧ガスと混合することができる。眼科用製剤、眼科用軟膏、粉末、および溶液もまた、本発明の範囲に包含されることが意図される。

40

【0051】

さらに、本開示は、キット（例えば、医薬品パッケージ）をさらに包含する。提供されるキットは、本明細書に記載の医薬組成物または化合物および容器（例えば、薬剤ボトル、アンプル、ボトル、シリンジおよび/またはサブパッケージ、または他の適切な容器）を含み得る。いくつかの実施形態において、提供されるキットは、任意に、本明細書に記

50

載の医薬組成物または化合物を希釈または懸濁するための医薬賦形剤を含む第2の容器をさらに含み得る。いくつかの実施形態において、第1および第2の容器において提供される本明細書に記載の医薬組成物または化合物は、組み合わせられて、単位剤形を形成する。

【0052】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のキットは、キットに含まれる化合物または医薬組成物の使用説明書をさらに含む。本明細書に記載のキットには、米国食品医薬品局（FDA）などの規制当局が必要とする情報が含まれていてもよい。いくつかの実施形態において、キットに含まれる情報は製剤情報である。いくつかの実施形態において、キットおよび説明書は、それを必要とする対象における増殖性疾患の治療、および/またはそれを必要とする対象における増殖性疾患の予防のために、提供される。本明細書に記載のキットは、別の組成物として1つまたは複数の追加の医薬製剤を含んでもよい。

10

【実施例】

【0053】

以下、本発明を特定の実施形態と組み合わせるさらに詳細に説明するが、本発明は、下記の実施形態に限定されるものではなく、これは本発明の具体的な実施形態をよく説明する目的として供するものであり、本発明の範囲を何らかの方法で限定するものとして解釈されるべきではない。実施形態に記載されていない条件は、従来条件である。特に断りのない限り、下記の実施形態で使用される試薬および装置はすべて市販の製品である。

【0054】

下記の実施形態における化合物の構造は、核磁気共鳴（NMR）または/および質量分析（MS）によって測定される。NMRの変位（ δ ）は10 - 6（ppm）の単位で与えられる。NMRの測定には、Bruker AVANCE - 400核磁気装置を使用する。溶媒は、重水素化ジメチルスルホキシド（DMSO - d₆）、重水素化クロロホルム（CDCl₃）、および重水素化メタノール（CD₃OD）であり、内部標準は、テトラメチルシラン（TMS）である。

20

【0055】

MSの測定には、FINNIGAN LCQAd（ESI）質量分析計（製造業者：Thermo、モデル：Finnigan LCQ advance max）を使用する。

【0056】

薄層クロマトグラフィー用のシリカゲルプレートとして、Yantai Huanghai HSGF254、または、Qingdao GF254のシリカゲルプレートを使用する。薄層クロマトグラフィー（TLC）用シリカゲルプレートの仕様は0.15mm ~ 0.2mmであり、生成物の分離および精製のための薄層クロマトグラフィー用のシリカゲルプレートの仕様は、0.4mm ~ 0.5mmである。

30

【0057】

カラムクロマトグラフィーは、一般に、Yantai Huanghaiシリカゲルの200 - 300メッシュシリカゲルを担体として使用する。

【0058】

実施形態において特に説明がない場合、反応温度は、室温、すなわち20 ~ 30である。

40

【0059】

薄層クロマトグラフィー（TLC）を使用して、実施形態における反応の過程を検出する。使用される展開系、および化合物を精製するために使用されるカラムクロマトグラフィーの溶離液系には、A：ジクロロメタンおよびメタノール系；B：n - ヘキサンおよび酢酸エチル系；C：石油エーテルおよび酢酸エチル系；D：アセトンおよび石油エーテル系が含まれ、溶媒の体積比は、化合物のさまざまな極性に依りて調整される。

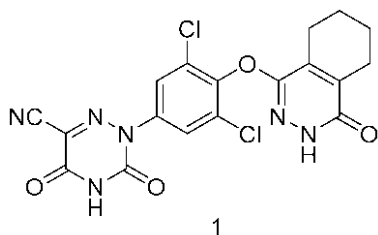
【0060】

実施形態1

2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキシ - 3, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 3, 5 - ジオキシ - 2, 3, 4, 5 - テト

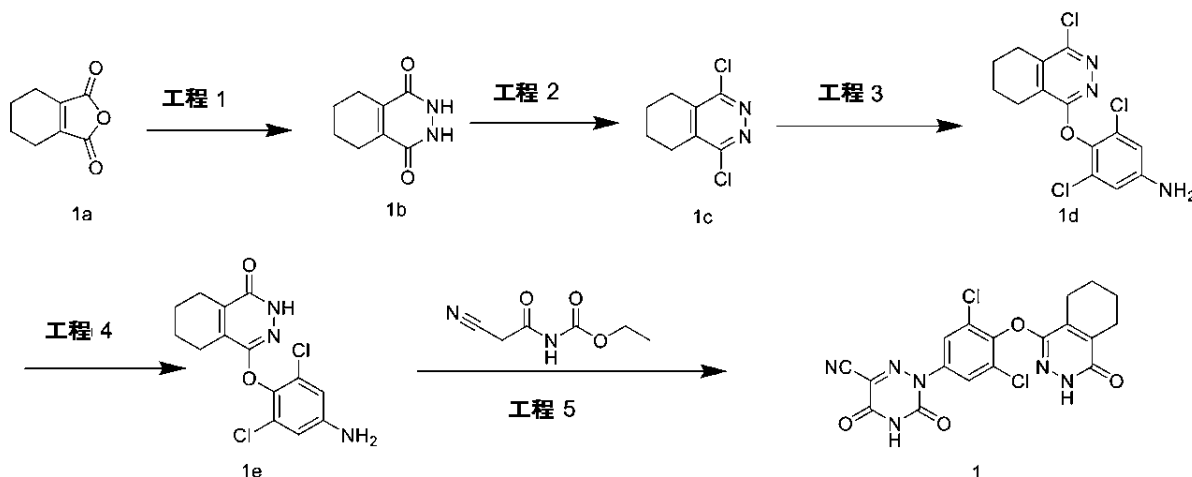
50

ラヒドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリルの製造
【化 1 0】



【化 1 1】

10



20

【0061】

工程 1

2, 3, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1, 4 - ジオン (化合物 1 b) の製造

酢酸ナトリウム (3.69 g、45 mmol)、およびヒドラジン塩酸塩 (3.08 g、45 mmol) を、化合物 3, 4, 5, 6 - テトラヒドロフタル酸無水物 1 a (4.56 g、30 mmol) の酢酸 (50 ml) および水 (100 ml) の溶液に、順次、加えた。添加後、混合物を、100 の温度に加熱し、3時間攪拌した。反応を停止させ、室温に自然冷却した。固体を沈殿させ、濾過して、化合物 1 b (4.2 g) を得て、この生成物をそのまま次の反応に使用した。

30

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 11.26 (s, 2H), 2.36 (s, 4H), 1.65 (s, 4H).

【0062】

工程 2

1, 4 - ジクロロ - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロフタラジン (化合物 1 c) の製造

化合物 1 b (1 g、6.02 mmol) をオキシ塩化リン (8 ml) に溶解した。系内の空気を窒素ガスで3回置き換えた。系を110 の温度に加熱し、3時間攪拌した。反応を停止させ、次に、自然冷却した。反応溶液を氷水にゆっくりと入れた。混合物を、1 N水酸化ナトリウム水溶液で、pH 10に調整し、酢酸エチルで3回抽出した。有機相を合わせ、有機相を飽和食塩水で洗浄し、濃縮し、乾燥して、化合物 1 c (1.1 g) を得た。生成物をそのまま次の反応に使用した。

40

【0063】

工程 3

3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - クロロ - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロフタラジン - 1 - イル) オキシ) アニリン (化合物 1 d) の製造

ジメチルスルホキシド (8 ml) を、化合物 1 c (1.0 g、5.0 mmol)、2, 6 - ジクロロ - 4 - アミノフェノール (0.93 g、6 mmol)、炭酸カリウム (2.76 g、20 mmol)、および Cu I (0.57 g、3 mmol) の混合物に加えた。

50

系内の空気を窒素ガスで3回置き換えた。系を100の温度に加熱し、3時間攪拌した。反応を停止させた後、冷却した。反応溶液の固体をまず濾過し、濾過残渣を酢酸エチルで繰り返し洗浄した。80mlの水を濾液に加え、その後、水相を酢酸エチルで抽出した。有機相を合わせ、飽和食塩水で洗浄した。濾過および溶媒濃縮後、カラムクロマトグラフィーにより、化合物1d(450mg)を得た。

【0064】

工程4

4-(4-アミノ-2,6-ジクロロフェノキシ)-5,6,7,8-テトラヒドロフタラジン-1(2H)-オン(化合物1e)の製造

化合物1d(100mg、0.3mmol)を酢酸(4ml)に溶解し、これに、酢酸ナトリウム(200mg、2.5mmol)を加えた。混合物を120の温度に加熱し、12時間攪拌した。反応を停止させた後、溶媒を減圧下、除去した。10mlの水を加え、次いで、1N水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH8に調整した。その後、酢酸エチル(10ml×3)で抽出し、有機相を合わせた。有機相を、飽和重炭酸ナトリウム水溶液および飽和食塩水でそれぞれ洗浄し、減圧下、濃縮し、灰色の固体を得た。10mlのメタノール、および10mlの1N水酸化ナトリウム水溶液を得られた固体に加え、混合物を120の温度に加熱し、12時間攪拌した。反応を停止させた後、メタノールを減圧下、濃縮した。残った水相を酢酸エチルで3回繰り返し抽出し、有機相を合わせた。溶媒を減圧下濃縮した後、薄層クロマトグラフィーによる分離および精製により、化合物1e(80mg)を得た。

【0065】

工程5

2-(3,5-ジクロロ-4-((4-オキソ-3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロフタラジン-1-イル)オキシ)フェニル)-3,5-ジオキソ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,2,4-トリアジン-6-ニトリル(化合物1)の製造

亜硝酸ナトリウム(16mg)を水(0.5ml)に溶解した。氷浴条件下、この溶液を、化合物1e(60mg、0.185mmol)、水(2.5ml)、および飽和塩酸水溶液(1.25ml)の混合物に、ゆっくりと滴下して加え、氷浴条件を維持して、溶液が透明になるまで0.5時間攪拌した。この温度で、N-シアノアセチルウレタン(32mg)の水(4.2ml)およびピリジン(1.3ml)の混合液をさらに滴下して加え、滴下後、一晚攪拌した。反応を停止させた後、黄色の固体を濾過して、水および石油エーテルで洗浄した。酢酸(5ml)および酢酸ナトリウム(160mg、2mmol)を、得られた固体に加えた。混合物を120の温度に加熱し、6時間攪拌した後、室温に冷却した。100mlの水を加え、淡黄色の固体が沈殿した。薄層クロマトグラフィー(DCM:MeOH=8:1)による分離および精製の後、化合物1(12.0mg)を得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 12.03 (s, 1H), 7.75 (s, 2H), 2.68-2.63 (m, 2H), 2.45-2.39 (m, 2H), 1.80-1.67 (m, 4H).

MS m/z (ESI): 447.4 [M+1].

【0066】

実施形態2

2-(3,5-ジクロロ-4-((4-オキソ-3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-5,8-エタノフタラジン-1-イル)オキシ)フェニル)-3,5-ジオキソ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,2,4-トリアジン-6-ニトリル(化合物2b)の製造

10

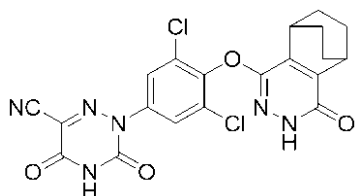
20

30

40

50

【化 1 2】



2

実施形態 1 の工程 1 において、原料 3, 4, 5, 6 - テトラヒドロフタル酸無水物 1 a を、ビスクロ [2 . 2 . 2] オクト - 2 - エン - 2, 3 - ジカルボン酸無水物に置き換えたこと以外は、実施形態 1 の合成経路を実施して、表題の生成物 2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 5, 8 - エタノフタラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 3, 5 - ジオキソ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 2) を製造した。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 12.13 (s, 1H), 7.77 (s, 2H), 1.88-1.73 (m, 4H), 1.39-1.17 (m, 6H).

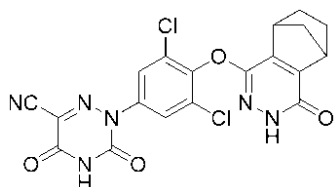
MS m/z (ESI): 473.2 [M+1].

【 0 0 6 7】

実施形態 3

2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 5, 8 - メタノフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3, 5 - ジオキソ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 3) の製造

【化 1 3】



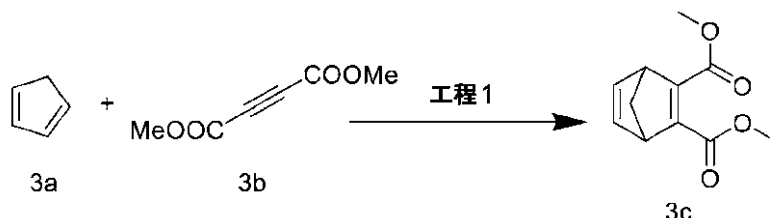
3

【 0 0 6 8】

工程 1

ジメチル - ビシクロ [2 . 2 . 1] ヘプタ - 2, 5 - ジエン - 2, 3 - ジカルボキシレートの製造

【化 1 4】



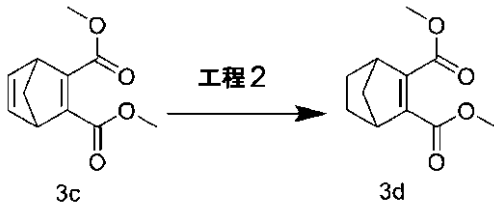
ジメチル アセチレンジカルボキシレート (化合物 3 b) (2 . 7 5 m l、2 2 . 3 m m o l) を、シクロペンタジエン (化合物 3 a) (1 . 4 7 5 g、2 2 . 3 m m o l) にゆっくりと滴下し、添加後、室温で 2 時間、攪拌した。反応を停止させ、油性の生成物 3 c (4 . 0 g) を得た。粗製の生成物を、精製することなく、そのまま次の反応に使用した。

【 0 0 6 9】

工程 2

ジメチル - ビシクロ [2 . 2 . 1] ヘプタ - 2 - エン - 2, 3 - ジカルボキシレートの製造

【化15】



化合物3c (1.0g, 4.8mmol)、パラジウム炭素(0.05g)、および、15mlのアセトン反応フラスコに入れ、水素バルーン下、3回置換を行った。系を室温で1時間攪拌した。濾過を行い、溶媒を濃縮し、減圧下で乾燥して、淡緑色の液体の生成物3d(0.9g)を得た。

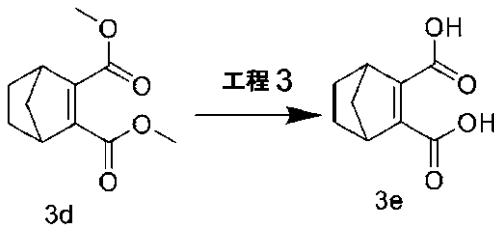
10

【0070】

工程3

ビスクロ[2.2.1]ヘプタ-2-エン-2,3-ジアシッドの製造

【化16】



20

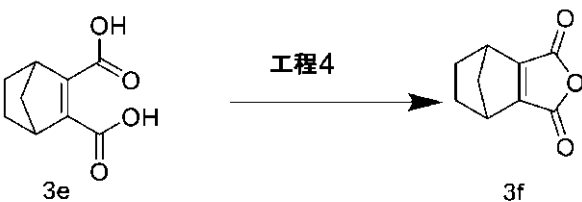
テトラヒドロフラン(20ml)および水(20ml)を、化合物3d(3.0g, 14.3mmol)、および水酸化リチウム一水和物(1.54g, 35.8mmol)の混合物に加え、室温で2時間、攪拌した。溶液を、2N希塩酸でpH1に調整し、酢酸エチルで3回抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧下濃縮し、白色の固体の化合物3e(2.0g)を得た。

【0071】

工程4

4,5,6,7-テトラヒドロ-4,7-メタノイソフェニルフラン1,3-ジオンの製造

【化17】



30

無水酢酸(10ml)を化合物3e(200mg, 1.1mmol)に加えた。混合物を100の温度に加熱し、2時間攪拌した。溶媒を、減圧下、濃縮して除去し、固体の化合物3f(200mg)の粗製の生成物を得た。

40

【0072】

工程5

2-(3,5-ジクロロ-4-(4-オキソ-3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-5,8-メタノフタラジン-1-イル)オキソ)フェニル)-3,5-ジオキソ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1,2,4-トリアジン-6-ニトリルの製造

実施形態1の工程1において、原料4,5,6,7-テトラヒドロイソベンゾフラン-1,3-ジオン(化合物1a)を、4,5,6,7-テトラヒドロ-4,7-メタノイソフェニルフラン1,3-ジオン(化合物3f)に置き換えたこと以外は、実施形態1の合

50

成経路を実施して、表題の生成物 2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキシ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロ - 5 , 8 - メタノフタラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキシ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 3) を製造した。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) 12.08 (s, 1H), 7.77 (s, 2H), 2.75-2.65 (m, 2H), 1.80-1.72 (m, 4H), 1.55-1.50 (m, 2H).

MS m/z (ESI): 459.0 [M+1].

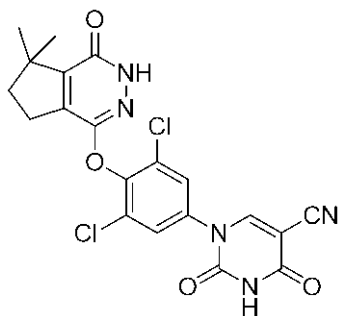
【 0 0 7 3 】

実施形態 4

1 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((7 , 7 - ジメチル - 1 - オキシ - 2 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタン [d] ピリダジン - 4 - イル) オキシ) フェニル) - 2 , 4 - ジオキシ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル (化合物 4) の製造

10

【 化 1 8 】



20

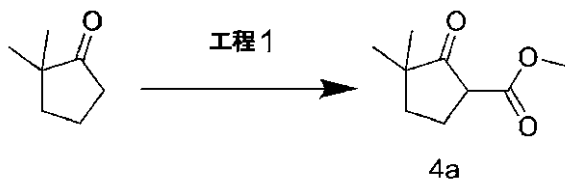
4

【 0 0 7 4 】

工程 1

メチル 3 , 3 - ジメチル - 2 - オキシシクロペンチル - 1 - カルボキシレートの製造

【 化 1 9 】



30

NAH (480 mg, 12 mmol) を、化合物 2 , 2 - ジメチルシクロペンタン - 1 - オン (1 . 12 g , 10 mmol) および MeOH (0 . 5 ml) の DMC (11 ml) 溶液に加えた。混合物を、82 の温度に加熱し、3時間攪拌し、冷却した。メタノール (0 . 5 ml) 、および酢酸 (1 ml) を順次、系に加え、系を氷水に注ぎ、ジクロロメタンで抽出し、乾燥し、減圧下で溶媒を除去して、無色の油性の化合物 4 a (1 . 7 g) を得て、そのまま次の工程に使用した。

40

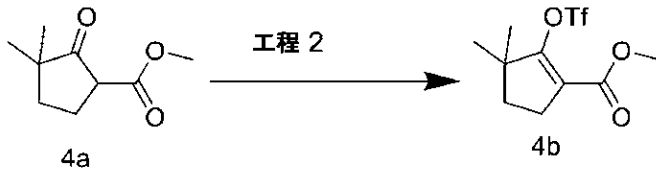
【 0 0 7 5 】

工程 2

メチル 3 , 3 - ジメチル - 2 - ((トリフルオロメチル) スルホ) オキシ) シクロペンタン - 1 - エン - 1 - カルボキシレートの製造

50

【化20】



- 60 で、トリフルオロ無水酢酸 (2 ml、12 mmol) を、化合物 4 a (1.7 g、10 mmol) およびジイソプロピルエチルアミン (8.2 ml、50 mmol) のジクロロメタン (17 ml) 溶液に、滴下して加えた。添加後、混合物をゆっくりと室温に昇温し、16時間撹拌した。50 mlの水をこれに加え、混合物を酢酸エチルで抽出し、減圧下で溶媒を除去し、カラムクロマトグラフィー (PE : EA = 50 : 1) により精製して、無色の油性の化合物 4 b (1.8 g) を得た。

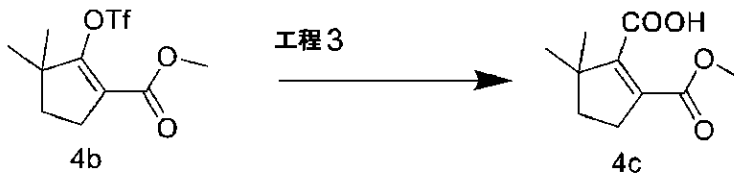
10

【0076】

工程3

2 - (メトキシカルボニル) - 5 , 5 - ジメチルシクロペント - 1 - エン - 1 - カルボン酸の製造

【化21】



20

窒素ガスバルーンの雰囲気下、DMF (25 ml) を、4 b (1.8 g、5.96 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (1.97 ml、11.92 mmol)、無水酢酸 (1.13 ml、11.92 mmol)、ギ酸ナトリウム (1.22 g、5.96 mmol)、酢酸パラジウム (66.9 mg、0.30 mmol)、および、塩化リチウム (758 mg、17.88 mmol) の混合物に加えた。添加後、系を室温で16時間撹拌し、系に300 mlの酢酸エチルを加えた。系を水および飽和食塩水で1回ずつ洗浄した。溶媒を減圧下で除去して、無色の油 4 c (1.2 g) を得た。

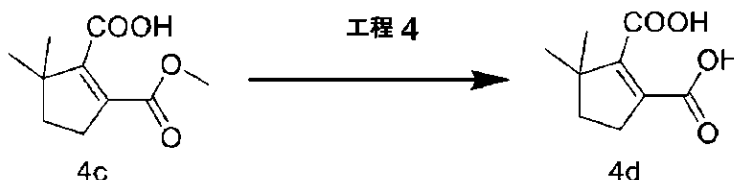
30

【0077】

工程4

3 , 3 - ジメチルシクロペント - 1 - エン - 1 , 2 - ジカルボン酸の製造

【化22】



40

メタノール (6 ml)、および水 (6 ml) を、4 c (1.2 g、6 mmol)、および水酸化リチウム一水和物 (756 mg、18 mmol) の混合物に加え、室温で3時間撹拌した。メタノールを、減圧下で除去し、次に、溶液を濃塩酸で pH 1 に調整し、酢酸エチルで抽出し、溶媒を減圧下で除去して、白色の固体の化合物 4 d (1.0 g) を得た。

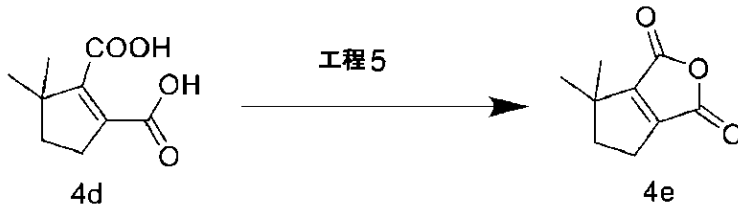
【0078】

工程5

4 , 4 - ジメチル - 5 , 6 - ジヒドロ - 1 H - シクロペンチル [c] フラン - 1 , 3 (4 H) - ジオンの製造

50

【化23】



無水酢酸 (10 ml) を化合物 4 d (1.0 g、5.43 mmol) に加えた。混合物を、100 の温度に加熱し、3時間攪拌し、冷却した。余分な無水酢酸を減圧下で除去して、淡褐色の液体の化合物 4 e (875 mg) を得て、これをそのまま次の工程に使用した。

10

【0079】

工程6

1 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((7, 7 - ジメチル - 1 - オキソ - 2, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタン [d] ピリダジン - 4 - イル) オキシ) フェニル) - 2, 4 - ジオキソ - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリルの製造

実施形態 1 の工程 1 において、原料 3, 4, 5, 6, - テトラヒドロフタル酸無水物 (化合物 1 a) を、4, 4 - ジメチル - 5, 6 - ジヒドロ - 1 H - シクロペンチル [c] フラン - 1, 3 (4 H) - ジオン (化合物 4 e) に置き換えたこと以外は、実施形態 1 の合成経路を実施して、表題の生成物 1 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((7, 7 - ジメチル - 1 - オキソ - 2, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタン [d] ピリダジン - 4 - イル) オキシ) フェニル) - 2, 4 - ジオキソ - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル (化合物 4) を製造した。

20

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) 12.09 (s, 1H), 7.79 (s, 2H), 2.97-2.93 (m, 2H), 2.01-1.98 (m, 2H), 1.34-1.20 (m, 6H).

MS m/z (ESI): 460.9 [M+1].

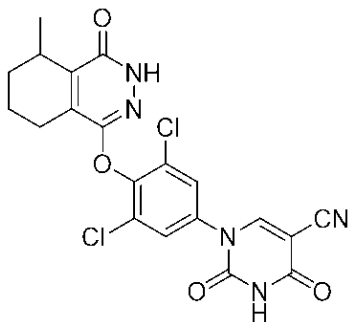
【0080】

実施形態5

1 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((5 - メチル - 4 - オキソ - 3, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 2, 4 - ジオキソ - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル (化合物 5) の製造

30

【化24】



40

5

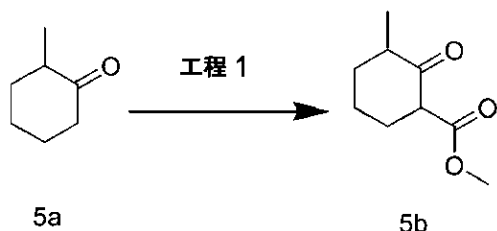
【0081】

工程1

メチル 3 - メチル - 2 - オキソシクロヘキサン - 1 - カルボキシレート 5 b の製造

50

【化25】



NaH (含有量60%、1.92g、48mmol)を、2-メチルシクロヘキサノン (化合物5a) (4.48g、40mmol)のジクロロメタン(50ml)溶液に加えた。混合物を還流加熱し、3時間攪拌し、冷却した。混合物をメタノール(0.5ml)および酢酸(1ml)で大まかにクエンチした。反応系を氷浴に加え、ジクロロメタンで抽出した。溶媒を減圧下で除去し、カラムクロマトグラフィーにより精製して、油(化合物5b)(5.6g)を得た。

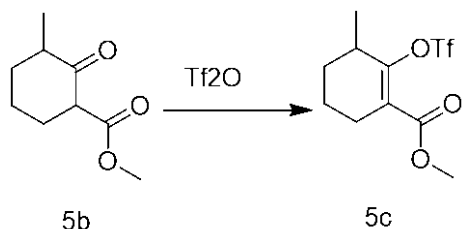
10

【0082】

工程2

メチル 3-メチル-2-((トリフルオロメチル)スルホ)オキシ)シクロヘキシル-1-エン-1-カルボキシレート

【化26】



20

氷浴条件下、NaH (含有量60%、600mg、25mmol)を、化合物5b(0.85g、5mmol)のエチルエーテル(20ml)液に加え、0.5時間攪拌した。次いで、トリフルオロメタンスルホン酸無水物(2.8g、10mmol)を、系に滴下して加え、さらに0の温度で1時間攪拌した。系をH₂O(50ml)の添加でクエンチし、1NのHClを加えてpH1に調整し、ジクロロメタンで抽出した。溶媒を減圧下で除去し、カラムクロマトグラフィー(PE:EA=20:1)により精製して、無色の油性の化合物5c(1.04g)を得た。

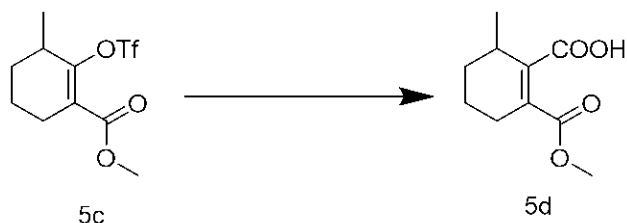
30

【0083】

工程3

2-(メトキシカルボニル)-6-メチルシクロヘキシル-1-エン-1-カルボン酸の製造

【化27】



40

窒素雰囲気下、ジイソプロピルエチルアミン(0.714g、7.00mmol)、および、無水酢酸(0.903g、7.00mmol)を、化合物5c(0.714g、10.5mmol)、および、ギ酸ナトリウム(0.714g、10.50mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(15ml)溶液に、順次、滴下して加え、室温で1時間攪

50

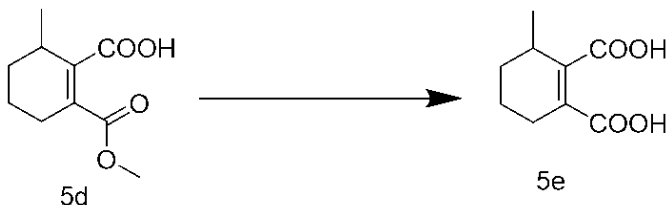
拌した。次いで、酢酸パラジウム（40 mg、0.18 mmol）、および塩化リチウム（445 mg、10.50 mmol）を加え、系を室温で一晩攪拌した。これに酢酸エチル（30 ml）を加え、混合物を水で洗浄した。溶媒を減圧下で除去し、淡黄色の油性の化合物 5 d（590 mg）を得た。

【0084】

工程 4

3 - メチルシクロヘキシル - 1 - エン - 1 , 2 - ジアシッド 5 e の製造

【化28】



10

水酸化リチウム一水和物（0.375 g、8.94 mmol）を、化合物 5 d（0.590 g、2.98 mmol）のメタノール（3 ml）および水（3 ml）の溶液に加え、室温で3時間攪拌した。次いで、メタノールを減圧下で除去した。1 Nの塩酸水溶液を加えて系を pH 1 に調整し、酢酸エチルで3回抽出した。有機相を合わせ、減圧下で濃縮し、溶媒除去して、油性の化合物 5 e（0.550 g）を得た。

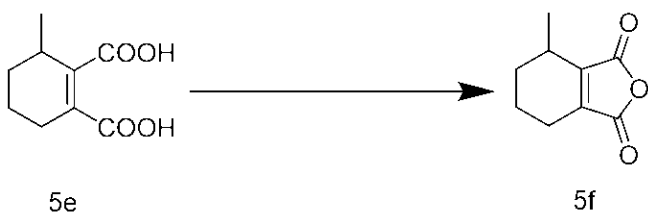
20

【0085】

工程 5

4 - メチル - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロイソフェニルフラン - 1 , 3 - ジオン 5 f の製造

【化29】



30

無水酢酸（6 ml）を化合物 5 e（0.550 g、2.99 mmol）に加えた。混合物を 100 の温度に加熱し、2時間攪拌した。系を冷却し、溶媒を減圧下で除去して、褐色の油性の化合物 5 f（0.34 g）を得て、そのまま次の工程に使用した。

【0086】

工程 6

1 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((5 - メチル - 4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 2 , 4 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル (化合物 5) の製造

40

実施形態 1 の工程 1 において、原料 3 , 4 , 5 , 6 , - テトラヒドロフタル酸無水物（化合物 1 a）を、4 - メチル - 4 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロイソフェニルフラン - 1 , 3 - ジオン（化合物 5 f）に置き換えたこと以外は、実施形態 1 の合成経路を実施して、表題の生成物 1 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((5 - メチル - 4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 2 , 4 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル（化合物 5）を製造した。

MS m/z (ESI): 460.1 [M+1]

【0087】

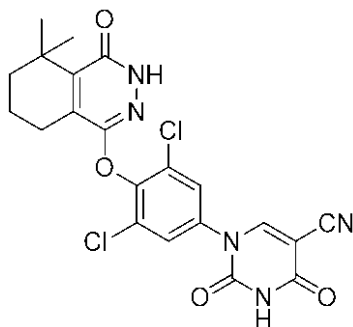
実施形態 6

1 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((5 , 5 - ジメチル - 4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7

50

、 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 2 , 4 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリルの製造

【化 3 0】



10

6

実施形態 5 の工程 1 において、原料 2 - メチルシクロヘキサノン (化合物 5 a) を、2 , 2 - ジメチルシクロヘキサノンに置き換えたこと以外は、実施形態 5 の合成経路を実施して、表題の生成物 1 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((5 , 5 - ジメチル - 4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 2 , 4 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル (化合物 6) を製造した。

20

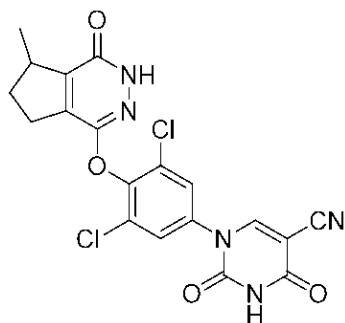
MS m/z (ESI): 474.1 [M+1]

【 0 0 8 8】

実施形態 7

1 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((7 - メチル - 1 - オキソ - 2 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンチル [d] ピリダジン - 4 - イル) オキソ) フェニル) - 2 , 4 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル (化合物 7) の製造

【化 3 1】



30

7

実施形態 5 の工程 1 において、原料 2 - メチルシクロヘキサノン (化合物 5 a) を、2 - メチルシクロペンタノンに置き換えたこと以外は、実施形態 5 の合成経路を実施して、表題の生成物 1 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((7 - メチル - 1 - オキソ - 2 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンチル [d] ピリダジン - 4 - イル) オキソ) フェニル) - 2 , 4 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル (化合物 7) を製造した。

40

MS m/z (ESI): 446.0 [M+1]

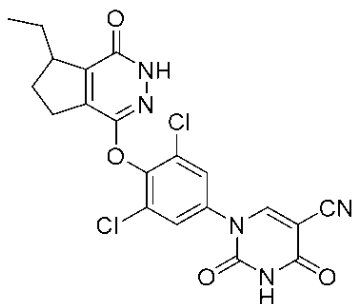
【 0 0 8 9】

実施形態 8

1 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((7 - エチル - 1 - オキソ - 2 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタン [d] ピリダジン - 4 - イル) オキソ) フェニル) - 2 , 4 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル (化合物 8) の製造

50

【化 3 2】



8

実施形態 5 の工程 1 において、原料 2 - メチルシクロヘキサノン (化合物 5 a) を、2 - エチルシクロペンタノンに置き換えたこと以外は、実施形態 5 の合成経路を実施して、表題の生成物 1 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((7 - エチル - 1 - オキソ - 2, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタン [d] ピリダジン - 4 - イル) オキソ) フェニル) - 2, 4 - ジオキソ - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル (化合物 8) を製造した。

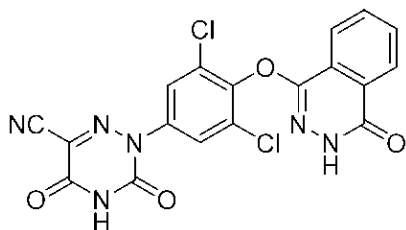
MS m/z (ESI): 460.1 [M+1]

【0090】

実施形態 9

2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3, 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3, 5 - ジオキソ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 9) の製造

【化 3 3】



9

実施形態 1 の工程 3 の原料 1, 4 - ジクロロ - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロフタラジン (化合物 1 c) を、1, 4 - ジクロロフタラジンに置き換えたこと以外は、実施形態 1 の合成経路を実施して、表題の生成物 2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3, 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3, 5 - ジオキソ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 9) を製造した。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 12.00(s, 1H), 8.31(d, J=8.0Hz, 1H), 8.26 (d, J=8.0Hz, 1H), 8.09 (t, J=12.0Hz 1H), 8.03 (t, J=16.0Hz 1H), 7.81 (s, 2H).

MS m/z (ESI): 443.0 [M+1].

【0091】

実施形態 10

2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((5 - クロロ - 4 - オキソ - 3, 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3, 5 - ジオキソ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 10) の製造

10

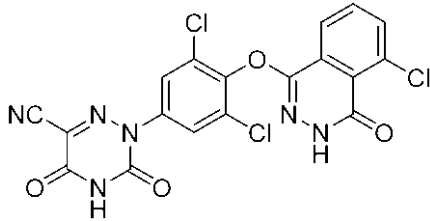
20

30

40

50

【化 3 4】



10

実施形態 1 の工程 1 において、原料 3, 4, 5, 6 - テトラヒドロフタル酸無水物 (化合物 1 a) を、3 - クロロフタル酸無水物に置き換えたこと以外は、実施形態 1 の合成経路を実施して、表題の生成物 2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((5 - クロロ - 4 - オキソ - 3, 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3, 5 - ジオキソ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 10) を製造した。

10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 12.00(s, 1H), 8.30 (d, J=8.0Hz, 1H), 8.15 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.95 (m, 1H), 7.80 (s, 2H).

MS m/z (ESI): 477.0 [M+1].

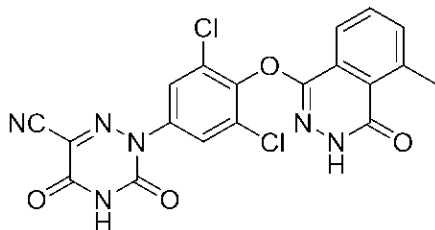
【0092】

実施形態 1 1

2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((5 - メチル - 4 - オキソ - 3, 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3, 5 - ジオキソ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 11) の製造

20

【化 3 5】



11

実施形態 1 の工程 1 において、原料 3, 4, 5, 6 - テトラヒドロフタル酸無水物 (化合物 1 a) を、3 - メチルフタル酸無水物に置き換えたこと以外は、実施形態 1 の合成経路を実施して、表題の生成物 2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((5 - メチル - 4 - オキソ - 3, 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3, 5 - ジオキソ - 2, 3, 4, 5 - テトラヒドロ - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 11) を製造した。

MS m/z (ESI): 456.9 [M+1].

【0093】

実施形態 1 2

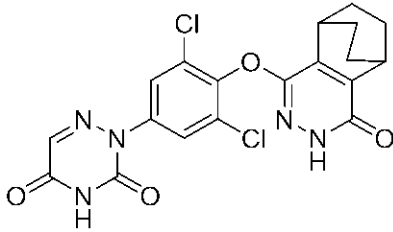
2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロ - 5, 8 - エタノフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 1, 2, 4 - トリアジン - 3, 5 (2H, 4H) - ジオン (化合物 12) の製造

30

40

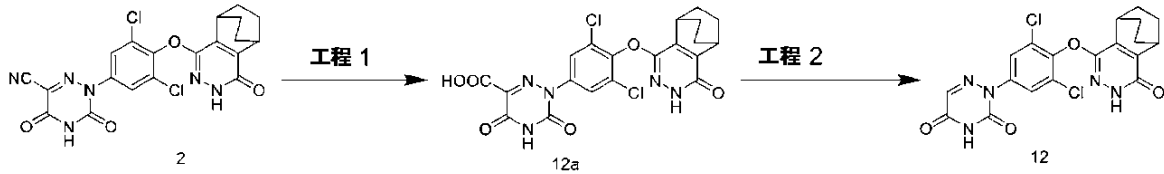
50

【化 3 6】



1 2

【化 3 7】



10

【 0 0 9 4】

工程 1

2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロ - 5 , 8 - エタノフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキソ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - カルボン酸の製造

20

酢酸 (4 m l)、および濃塩酸 (1 m l) をそれぞれ、化合物 2 (7 7 m g) に加え、1 2 0 の温度に加熱し、5 時間攪拌し、冷却した。反応溶液を水で希釈した。得られた固体を濾過し、水で洗浄し、石油エーテルで洗浄して、固体の化合物 1 2 a (3 5 m g) を得て、そのまま次の反応に使用した。

【 0 0 9 5】

工程 2

2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロ - 5 , 8 - エタノフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 3 , 5 (2 H , 4 H) - ジオンの製造

30

メルカプト酢酸 (2 m l) を化合物 1 2 a (3 5 . 0 m g) に加え、混合物を 1 7 0 の温度に加熱し、2 時間攪拌した。混合物を冷却し、1 N の水酸化ナトリウム水溶液で p H 8 に調整し、酢酸エチルで 3 回抽出した。有機相を合わせた。溶媒を減圧下で除去し、薄層クロマトグラフィー (D C M : M e O H = 8 : 1) により分離および精製して、化合物 1 2 (1 0 . 0 m g) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (4 0 0 M H z , D M S O - d ₆) : 1 2 . 1 0 (s , 1 H) , 7 . 7 7 (s , 2 H) , 7 . 3 3 (s , 1 H) , 2 . 0 1 (m , 2 H) , 1 . 9 3 - 1 . 7 5 (m , 4 H) , 1 . 3 9 - 1 . 2 7 (m , 4 H) .

MS m/z (E S I) : 4 4 8 . 0 [M + 1] .

【 0 0 9 6】

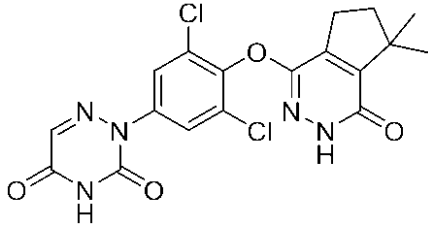
実施形態 1 3

2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((7 , 7 - ジメチル - 1 - オキソ - 2 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンチル [d] ピリダジン - 4 - イル) オキソ) フェニル) - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 3 , 5 (2 H , 4 H) - ジオン (化合物 1 3) の製造

40

50

【化 3 8】



1 3

実施形態 1 2 の工程 1 において、原料 2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロ - 5 , 8 - エタノフタラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキソ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 2) を、1 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((7 , 7 - ジメチル - 1 - オキソ - 2 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンタン [d] ピリダジン - 4 - イル) オキシ) フェニル) - 2 , 4 - ジオキソ - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロピリミジン - 5 - ニトリル (化合物 4) に置き換えたこと以外は、実施形態 1 2 の合成経路を実施して、表題の生成物 2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((7 , 7 - ジメチル - 1 - オキソ - 2 , 5 , 6 , 7 - テトラヒドロ - 1 H - シクロペンチル [d] ピリダジン - 4 - イル) オキソ) フェニル) - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 3 , 5 (2 H , 4 H) - ジオン (化合物 13) を製造した。

10

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 12.02 (s, 1H), 7.77 (s, 2H), 7.35 (s, 1H), 2.94-2.90 (m, 2H), 1.99-1.95 (m, 2H), 1.32 (d, 6H).

MS m/z (ESI): 436.0 [M+1].

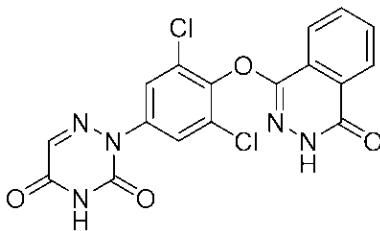
20

【 0 0 9 7】

実施形態 1 4

2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 3 , 5 - (2 H , 4 H) ジオン (化合物 1 4) の製造

【化 3 9】



1 4

実施形態 1 2 の工程 1 において、原料 2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロ - 5 , 8 - エタノフタラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキソ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 2) を、2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキソ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 9) に置き換えたこと以外は、実施形態 1 2 の合成経路を実施して、表題の生成物 2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 3 , 5 - (2 H , 4 H) ジオン (化合物 1 4) を製造した。

40

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): 12.00 (s, 1H), 8.30-8.23 (m, 2H), 8.09-7.99 (m, 2H), 7.18 (s, 1H).

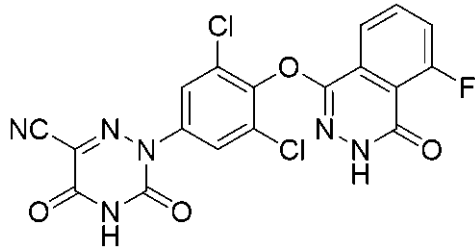
MS m/z (ESI): 418.0 [M+1].

【 0 0 9 8】

50

実施形態 15

2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((5 - フルオロ - 4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキソ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 15) の製造
【化 40】



15

10

実施形態 1 の工程 1 において、原料 3 , 4 , 5 , 6 , - テトラヒドロフタル酸無水物 (化合物 1 a) を、3 - フルオロフタル酸無水物に置き換えたこと以外は、実施形態 1 の合成経路を実施して、表題の生成物 2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((5 - フルオロ - 4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキソ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 15) を製造した。

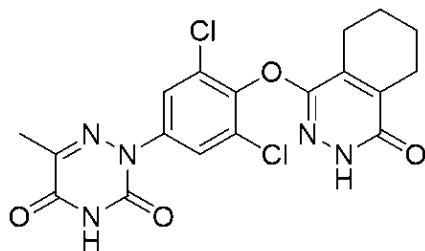
20

MS m/z (ESI): 461.0 [M+1].

【 0 0 9 9 】

実施形態 16

2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 6 - メチル - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 3 , 5 (2 H , 4 H) - ジオン (化合物 16) の製造
【化 41】



16

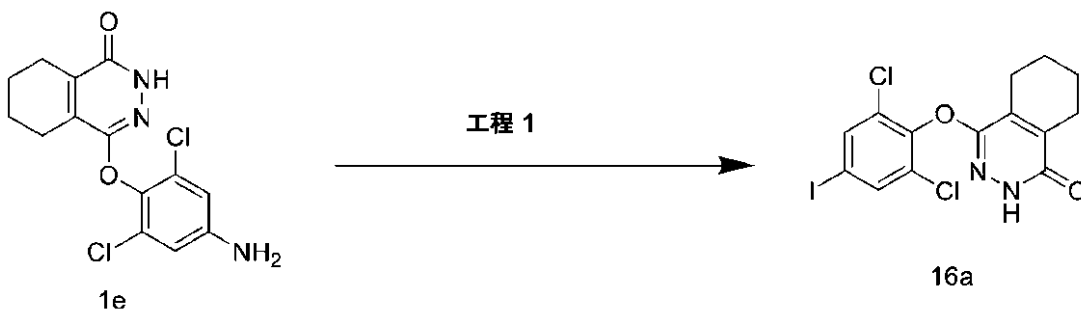
30

【 0 1 0 0 】

工程 1

4 - (2 , 6 - ジクロロ - 4 - ヨードフェノキシ) - 5 , 6 , 7 , 8 - テトラヒドロフタラジン - 1 (2 H) - オン (化合物 16 a) の製造
【化 42】

40



1e

16a

50

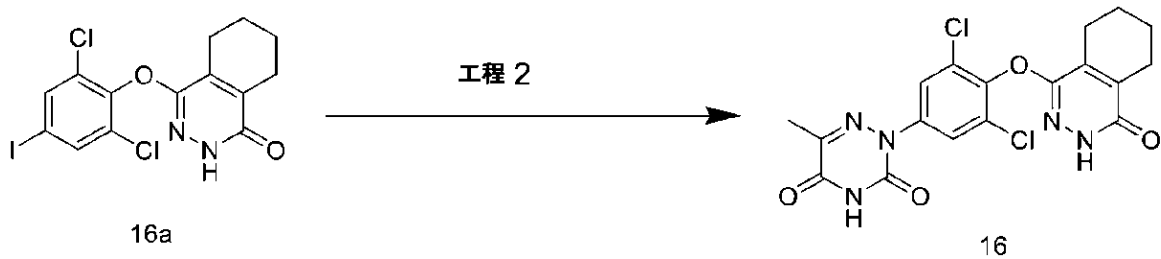
氷浴条件下、水（4 ml）および濃塩酸（2 ml）を、順次、1 e（100 mg）に加え、次に、亜硝酸ナトリウム（30 mg）の水（2 ml）の溶液を滴下して加えた。氷浴条件を維持して反応物を1時間攪拌した。ヨウ化カリウム（104 mg）を滴下して加え、混合物を室温に昇温し、16時間攪拌した。混合物をジクロロメタンで抽出し、溶媒を減圧下で除去して、黄色の固体16a（100 mg）を得て、そのまま次の反応に使用した。

【0101】

工程2

2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 6 - メチル - 1, 2, 4 - トリアジン - 3, 5 (2H, 4H) - ジオン (化合物16) の製造

【化43】



16a

16

N, N - ジカルボンアミド（2.0 ml）を、化合物16a（20 mg）、6 - アザチミン（6.6 mg）、ヨウ化第一銅（8.9 mg）、および炭酸カリウム（30 mg）の混合物に加え、系を120の温度に加熱し、12時間攪拌した。系を冷却し、濾過し、酢酸エチルを添加して水から分離した。溶媒を減圧下で有機相から除去し、薄層クロマトグラフィー（DCM : MeOH = 8 : 1）により分離および精製して、化合物16（5.0 mg）を得た。

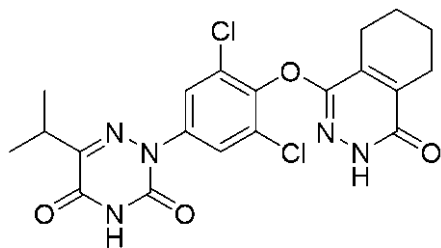
MS m/z (ESI): 436.1 [M+1].

【0102】

実施形態17

2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 6 - イソプロピル - 1, 2, 4 - トリアジン - 3, 5 (2H, 4H) - ジオン (化合物17) の製造

【化44】



17

実施形態16の工程2において、原料6 - アザチミンを、6 - イソプロピル - 1, 2, 4 - トリアジン - 3, 5 (2H, 4H) - ジオン（「Chemistry and Biodiversity, 2012, 9(3)536-556」の既知の方法を実施して製造）に置き換えたこと以外は、実施形態16の合成経路を実施して、表題の生成物2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3, 4, 5, 6, 7, 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 6 - イソプロピル - 1, 2, 4 - トリアジン - 3, 5 (2H, 4H) - ジオン (化合物17) を製造した。

MS m/z (ESI): 464.1 [M+1].

10

20

30

40

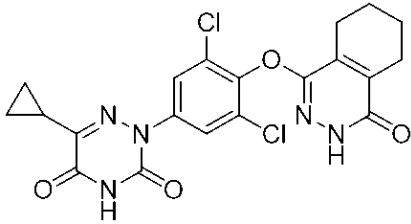
50

【 0 1 0 3 】

実施形態 1 8

6 - シクロプロピル - 2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 3 , 5 (2 H , 4 H) - ジオン (化合物 1 8) の製造

【 化 4 5 】



18

10

実施形態 1 6 の工程 2 において、原料 6 - アザチミンを、6 - シクロプロピル - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 3 , 5 (2 H , 4 H) - ジオン (「 Collection of Czechoslovak Chemical Communications、1975、40、1038 - 1041 」 の既知の方法を実施して製造) に置き換えたこと以外は、実施形態 1 6 の合成経路を実施して、表題の生成物 2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 , 5 , 6 , 7 , 8 - ヘキサヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 6 - シクロプロピル - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 3 , 5 (2 H , 4 H) - ジオン (化合物 1 8) を製造した。

20

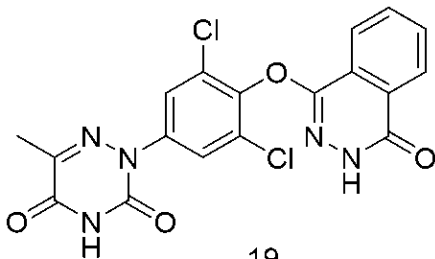
MS m/z (ESI): 462.1 [M+1].

【 0 1 0 4 】

実施形態 1 9

2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキソ) フェニル) - 6 - メチル - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 3 , 5 (2 H , 4 H) - ジオン (化合物 1 9) の製造

【 化 4 6 】



19

30

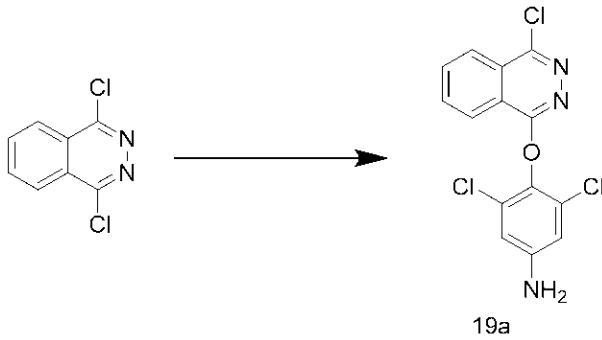
【 0 1 0 5 】

工程 1

3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - クロロフタラジン - 1 - イル) オキソ) アニリン (化合物 1 9 a) の製造

40

【化 4 7】



10

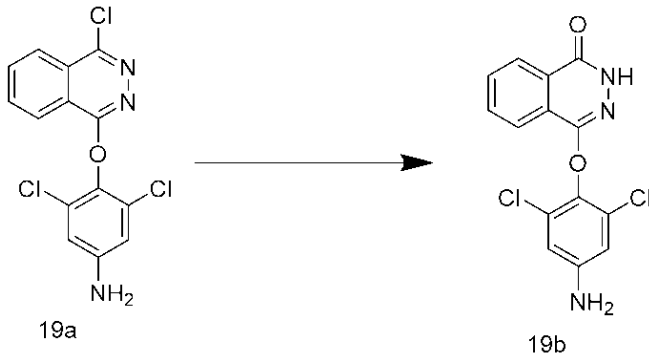
実施形態 1 における 1, 4 - ジクロロ - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロフタラジン (化合物 1 c) を、1, 4 - ジクロロフタラジンに置き換えたこと以外は、実施形態 1 の工程 3 の中間体 1 d の合成経路を実施して、表題の生成物 3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - クロロフタラジン - 1 - イル) オキシ) アニリン (化合物 1 9 a) を製造した。

【 0 1 0 6】

工程 2

4 - (4 - アミノ - 2, 6 - ジクロロフェノキシ) フタラジン - 1 (2 H) - オン (化合物 1 9 b) の製造

【化 4 8】



20

実施形態 1 における 3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - クロロ - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロフタラジン - 1 - イル) オキシ) アニリン (化合物 1 d) を、3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - クロロフタラジン - 1 - イル) オキシ) アニリン (化合物 1 9 a) に置き換えたこと以外は、実施形態 1 の工程 4 の中間体 1 e の合成経路を実施して、表題の生成物 4 - (4 - アミノ - 2, 6 - ジクロロフェノキシ) フタラジン - 1 (2 H) - オン (化合物 1 9 b) を製造した。

【 0 1 0 7】

工程 3

2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキシ - 3, 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 6 - メチル - 1, 2, 4 - トリアジン - 3, 5 (2 H, 4 H) - ジオン (化合物 1 9) の製造

40

実施形態 1 6 の工程 1 において、4 - (2, 6 - ジクロロ - 4 - ヨードフェノキシ) - 5, 6, 7, 8 - テトラヒドロフタラジン - 1 (2 H) - オン (化合物 1 6 a) を、化合物 4 - (4 - アミノ - 2, 6 - ジクロロフェノキシ) フタラジン - 1 (2 H) - オン (化合物 1 9 b) に置き換えたこと以外は、実施形態 1 6 の合成経路を実施して、表題の生成物 2 - (3, 5 - ジクロロ - 4 - ((4 - オキシ - 3, 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 6 - メチル - 1, 2, 4 - トリアジン - 3, 5 (2 H, 4 H) - ジオン (化合物 1 9) を製造した。

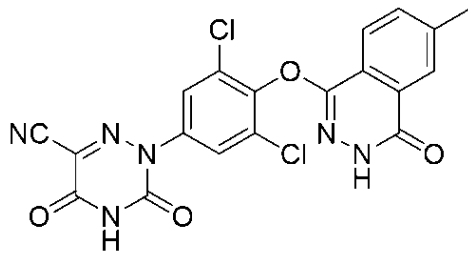
MS m/z (ESI): 432.0 [M+1].

【 0 1 0 8】

50

実施形態 20

2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((6 - メチル - 4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキソ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 20) の製造
【化 49】



20

10

実施形態 1 の工程 1 において、原料テトラヒドロフタル酸無水物 (1 a) を、4 - メチル
フタル酸無水物に置き換えたこと以外は、実施形態 1 の合成経路を実施して、表題の生
成物 2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((6 - メチル - 4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロフタ
ラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキソ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒ
ドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 20) を製造した。

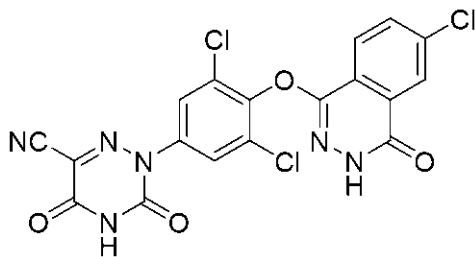
MS m/z (ESI): 457.0 [M+1].

20

【0109】

実施形態 21

2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((6 - クロロ - 4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロフタラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキソ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 21) の製造
【化 50】



21

30

実施形態 1 の工程 1 において、原料テトラヒドロフタル酸無水物 (1 a) を、4 - クロ
ロフタル酸無水物に置き換えたこと以外は、実施形態 1 の合成経路を実施して、表題の生
成物 2 - (3 , 5 - ジクロロ - 4 - ((6 - クロロ - 4 - オキソ - 3 , 4 - ジヒドロフタ
ラジン - 1 - イル) オキシ) フェニル) - 3 , 5 - ジオキソ - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒ
ドロ - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - ニトリル (化合物 21) を製造した。

MS m/z (ESI): 477.0 [M+1].

40

【0110】

試験 1 : TR に対する化合物の結合力の試験

1. 主な実験材料と装置

Envision 2104 マイクロプレートリーダー ;

ビオチン - SRC 2 - 2 コアクチベーターペプチド (Sangon Biotech (Shanghai) Co . , Ltd . から市販) ;

TR LBD、GST (ThermoFisher から市販) (Art . No . PV 4 7 6 2) ;

ユウロピウム結合抗グルタチオン抗体 (Cisbio から市販) (Art . No . 6 1

50

G S T K L B) ; および、

ストレプトアビジン - D 2 (C i s b i o から市販) (A r t . N o . 6 1 0 S A D A B)

【 0 1 1 1 】

2 . 化合物の調製と処理

2 . 1 化合物のジメチルスルホキシドストック溶液の調製

すべての化合物をジメチルスルホキシドに溶解して、10 mmol のストック溶液を調製した。

2 . 2 化合物の保管

化合物をジメチルスルホキシドに溶解した後、溶液をデシケーター内で室温で3ヶ月間保管することができる。長期保管の場合、化合物を - 2 0 の冷凍庫に入れる。

10

【 0 1 1 2 】

3 . 実験ステップ

3 . 1 1 x 反応バッファの調製

3 . 2 化合物のスクリーニング

a) 100%ジメチルスルホキシドを使用して、ポジティブ薬物のトリヨードサイロニン (T 3) を 10 mmol (100 x) から、または試験する化合物を 1 mmol (100 x) から、1 : 3 の等しい比率で、合計 10 個の濃度に希釈した。

b) 4 x 濃度勾配希釈化合物を 1 x 反応バッファで調製した。

c) 5 μ l の 4 x 濃度勾配希釈化合物を 384 ウェル試験プレートに添加した。

20

d) 4 x T R L B D および 4 x R X R を 1 x 反応バッファで調製した。

e) 5 μ l の 4 x T R L B D および 4 x R X R を 384 ウェル試験プレートに添加した。

f) 2 x ビオチン - S R C 2 - 2、2 x ユーロピウム結合抗グルタチオン抗体、および 2 x ストレプトアビジン - d 2 を、1 x 反応バッファで調製した。

g) 10 μ l の 2 x 混合溶液 (ステップ f 参照) を 384 ウェル試験プレートに添加した。

h) 384 ウェル試験プレートを遠心分離機で1分間に1000回転で遠心分離した。

i) 光から保護しながら、室温で1時間、インキュベーションを行った。

j) 波長 665 nm および 615 nm における 384 ウェル試験プレートの各ウェルの蛍光シグナル値を E n v i s i o n 2 1 0 4 マイクロプレートリーダーで記録し、665 nm / 615 nm の蛍光比を計算した。

30

【 0 1 1 3 】

4 . データ分析

4 . 1 各ウェルの相対比 (比_{665nm/615nm} - 比_{ブランク}) の計算

4 . 2 活性率は、下記のように計算した。

【 数 1 】

$$\text{活性(\%)} = \left[\frac{\overline{\text{比}}_{\text{化合物}} - \overline{\text{比}}_{\text{ブランク}}}{\overline{\text{比}}_{\text{ポジティブ}} - \overline{\text{比}}_{\text{ブランク}}} \right] \times 100$$

40

$\overline{\text{比}}_{\text{化合物}}$: 実施形態の化合物のウェルの相対比の平均

$\overline{\text{比}}_{\text{ポジティブ}}$: すべてのポジティブコントロールのウェルの相対比の平均

$\overline{\text{比}}_{\text{ブランク}}$: すべてのネガティブコントロールのウェルの相対比の平均

50

4.3 曲線プロットとEC50の計算

EC50は、Graphpad 5.0を使用して非線形回帰法で計算し、化合物の活性(%)と対数濃度の関係に適合させた。

$$Y = \text{最小} + (\text{最大} - \text{最小}) / (1 + 10^{-(\text{Log EC50} - X) \times \text{傾き}})$$

X: 化合物の対数濃度、Y: 活性(パーセント)

【0114】

下記の表1に特定の試験データを示す。

【0115】

試験2: TR に対する化合物のアゴニスト活性の評価

1. 主な実験材料と装置

Envision 2104 マイクロプレートリーダー
HEK293T細胞株(ATCCから市販)(Art.No.: CRL-3216)
pGL4.35[luc2P/9XGAL4 UAS/Hygro](Promegaから市販)(Art.No.: E1370)
pBIND-TR プラスミド(Pharmonから)
pBIND-RXR プラスミド(Pharmonから)
LipolTXトランスフェクション剤(ThermoFisherから市販)(Art.No.: 15338-100)

【0116】

2. 化合物の調製

2.1 化合物の溶解

化合物粉末は、標準的なスキームに従って、10mmolのジメチルスルホキシドストック溶液に調製した。

2.2 化合物保管

ジメチルスルホキシドに溶解したすべての化合物は、デシケーター内で室温で短期間保管するか、-20℃で長期間保管した。

2.3 実験化合物の調製

2.3.1 試験するすべての化合物を、10μmolの初期濃度から開始して、ジメチルスルホキシドにより3倍勾配で10個の希釈勾配に希釈した。

2.3.2 ポジティブコントロールのトリヨードサイロニン(T3)を、16.67μmolの初期濃度から開始して、ジメチルスルホキシドにより3倍勾配で10個の希釈勾配に希釈した。

2.3.3 166.7倍のポジティブコントロール(16.67μmol、トリヨードサイロニン(T3))および166.7倍のネガティブコントロール(100%ジメチルスルホキシド)を調製した。

2.4 化合物のプレートを開けて、5分間振とうした。

【0117】

3 実験プロセス

3.1 細胞懸濁液の調製およびプレート播種

a) すべての細胞をATCC標準操作に従って培養し、HEK293Tを指数増殖期に試験した。

b) 培地を廃棄した。

c) 細胞をリン酸緩衝液で2回洗浄した。

d) トリプシン処理溶液を加えて細胞を処理し、完全培地で処理を停止した。

e) 細胞を収集してカウントし、細胞の生存率が90%を超えた場合にのみ実験を実施できた。

f) 2.5×10^6 個のHEK293-LUC細胞を60mmの細胞培養皿に播種した。

g) 細胞を播種した培養皿を、37℃、5%CO₂のインキュベーターに入れ、一晚培養した。

3.2 細胞トランスフェクション

10

20

30

40

50

a) Lip o L T Xトランスフェクション剤を平衡化のために室温に置いた。

b) 6 μ lのP l u s剤および6 μ gのD N Aを、250 μ lのO p t i - M E M (商標)培地にチューブ壁に接触させずに加え、ピペッティングガンによるブローとピペッティングにより均一に混合した。そして、
プラスミド：2.5 μ gのp B I N D - T R、2.5 μ gのp B I N D - R X R、および1 μ gのp G L 4.35プラスミドがそれぞれ添加された。

c) 12 μ lのL i p o L T Xおよび250 μ lのO p t i - M E M (商標)培地をチューブの壁に接触させずに加え、ピペッティングガンによるブローとピペッティングにより均一に混合した。

d) D N A P l u s (ステップ3.2.b参照)と混合した薬剤を、希釈したL i p o L T X (ステップ3.2.c参照)トランスフェクション剤に添加し、室温で15分間静置した。

e) D N Aと混合したトランスフェクション剤を60 mmの細胞培養皿(ステップ3.1参照)に加えた。

f) 培養皿を、37、5% C O₂のインキュベーターに入れ、5時間培養した。

3.3 化合物の処理

a) 150 n lの希釈化合物(ステップ2.3参照)をE c h o 5 5 0によって細胞培養プレート(6007680-50、P E)に移した。

b) 細胞(ステップ3.2参照)を384細胞培養プレート(6007680-50、P E)に、1ウェルあたり15,000個の細胞および25 μ lの培地(5%ウシ胎児血清を含む)となるように、播種した。

c) 細胞を、37、5% C O₂のインキュベーターで一晩培養した。

3.4 化合物の検出

a) S t e a d y - G l o (商標)検出剤を室温に置いた。

b) 384細胞プレート(ステップ3.3参照)を室温に置いた。

c) 1ウェルあたり25 μ lのS t e a d y - G l o (商標)検出剤を細胞培養プレート(ステップ3.4.b参照)に添加した。

d) プレートを振とう機に置き、光から保護しながら5分間振とうした。

e) 化学発光値をE n v i s i o n 2 1 0 4マイクロプレートリーダーで検出した。

【0118】

4. データ分析

4.1 活性(%)の計算

【数2】

$$\text{活性(\%)} = \left[\frac{\overline{\text{RLU}}_{\text{化合物}} - \overline{\text{RLU}}_{\text{ブランク}}}{\overline{\text{RLU}}_{\text{ポジティブ}} - \overline{\text{RLU}}_{\text{ブランク}}} \right] \times 100$$

RLU：発生した蛍光

$\overline{\text{RLU}}_{\text{化合物}}$ ：実施形態の化合物のウェル平均

$\overline{\text{RLU}}_{\text{ポジティブ}}$ ：ポジティブコントロールの平均

$\overline{\text{RLU}}_{\text{ブランク}}$ ：ネガティブコントロールの平均

4.2 E C 5 0の計算、および化合物の用量 - 効果の曲線のプロット

化合物のE C 5 0は、G r a p h p a d 5 . 0を使用して計算し、化合物の活性(%)および対数濃度に適合させた。

$$Y = \text{最小} + (\text{最大} - \text{最小}) / (1 + 10^{((\text{Log I C 5 0} - X) \times \text{傾き}))})$$

X：化合物の対数濃度、Y：阻害率(パーセント)

10

20

30

40

50

【0119】

下記の表1に特定の試験データを示す。

【0120】

試験3：TR に対する化合物の結合力の試験

1. 主な実験材料と装置

Envision 2104 マイクロプレートリーダー；
 ビオチン-SRC2-2 コアクチベーターペプチド (Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd. から市販)
 TR LBD、GST (ThermoFisher から市販) (Art. No. PV4762)
 ユーロピウム結合抗グルタチオン抗体 (Cisbio から市販) (Art. No. 61GSTKLB)
 ストレプトアビジン-D2 (Cisbio から市販) (Art. No. 610SADAB)

10

【0121】

2. 化合物の調製と処理

2.1 化合物のジメチルスルホキシドストック溶液の調製

すべての化合物をジメチルスルホキシドに溶解して、10 mmol のストック溶液を調製した。

2.2 化合物の保管

化合物をジメチルスルホキシドに溶解した後、溶液をデシケーター内で室温で3ヶ月間保管することができる。長期保管の場合、化合物を -20 の冷凍庫に入れる。

20

【0122】

3. 実験ステップ

3.1 1x 反応バッファの調製

3.2 化合物スクリーニング

a) 100% ジメチルスルホキシドを使用して、ポジティブ薬物のトリヨードサイロニン (T3) を 10 μ mol (100x) から、または試験する化合物を 1 mmol (100x) から、1:3 の等しい比率で、合計 10 個の濃度に希釈した。

b) 4x 濃度勾配希釈化合物を 1x 反応バッファで調製した。

30

c) 5 μ l の 4x 濃度勾配希釈化合物を 384 ウェル試験プレートに添加した。

d) 4x TR LBD および 4x RXR を 1x 反応バッファで調製した。

e) 5 μ l の 4x TR LBD および 4x RXR を 384 ウェル試験プレートに添加した。

f) 2x ビオチン-SRC2-2、2x ユーロピウム結合抗グルタチオン抗体、および 2x ストレプトアビジン-d2 を、1x 反応バッファで調製した。

g) 10 μ l の 2x 混合溶液 (ステップ f 参照) を 384 ウェル試験プレートに添加した。

h) 384 ウェル試験プレートを遠心分離機で1分間に1000回転で遠心分離した。

i) 光から保護しながら、室温で1時間、インキュベーションを行った。

40

j) 波長 665 nm および 615 nm における 384 ウェル試験プレートの各ウェルの蛍光シグナル値を Envision 2104 マイクロプレートリーダーで記録し、665 nm / 615 nm の蛍光比を計算した。

【0123】

4. データ分析

4.1 各ウェルの相対比 (比665nm/615nm - 比ブランク) の計算

4.2 活性率は、下記のように計算した。

【数3】

50

$$\text{活性(\%)} = \left[\frac{\overline{\text{比}}_{\text{化合物}} - \overline{\text{比}}_{\text{ブランク}}}{\overline{\text{比}}_{\text{ポジティブ}} - \overline{\text{比}}_{\text{ブランク}}} \right] \times 100$$

$\overline{\text{比}}_{\text{化合物}}$: 実施形態の化合物のウェルの相対比の平均

$\overline{\text{比}}_{\text{ポジティブ}}$: すべてのポジティブコントロールのウェルの相対比の平均

10

$\overline{\text{比}}_{\text{ブランク}}$: すべてのネガティブコントロールのウェルの相対比の平均

4.3 曲線プロットとEC50の計算

EC50は、Graphpad 5.0を使用して非線形回帰法で計算し、化合物の活性(%)と対数濃度の関係を適合させた。

$$Y = \text{最小} + (\text{最大} - \text{最小}) / (1 + 10^{((\text{Log EC50} - X) \times \text{傾き})})$$

X : 化合物の対数濃度、Y : 活性(パーセント)

【0124】

20

下記の表1に特定の試験データを示す。

【0125】

表1 サイロキシン受容体 に対する化合物の結合活性を以下に示す。

【表1】

実施形態	IC50		
	THRβ 結合力 (μM)	THRα 結合力 (μM)	THRα/β 選択性 (係数)
実施形態 1	1.23	>10	>8.1
実施形態 2	2.33	>10	>4.29
実施形態 3	5.2	>10	>1.92
実施形態 4	0.36	4.3	>11.9
実施形態 9	0.17	>10	>58.8
実施形態 10	1.47	>10	>6.80
実施形態 11	1.78	>10	5.61
実施形態 12	0.80	0.2	0.25
実施形態 13	0.17	1.22	7.17
実施形態 14	0.262		
比較化合物 53	0.26	5.0	19.2
T3	0.00052	0.00026	

30

40

【0126】

結論

開示の比較化合物53と比較して、本発明によるいくつかの化合物は、予想以上に高いTHR活性(<0.2 μM)を示し、いくつかの化合物は、比較化合物53よりもTH

50

R に対して高い選択性を示した。

【0127】

試験4：TR 受容体に対する化合物のアゴニスト活性の評価

実験の要約

TR - LBDおよびRXR - LBDコード配列を、それぞれ、pBINDプラスミド (Promega、E1581) に挿入した。発現ベクターおよびレポーターベクター (安定した統合GAL4プロモーターによって駆動されるルシフェラーゼレポーター遺伝子を保有するpGL4.35) を、宿主細胞で共発現させた。アゴニストが対応するキメラ受容体に結合すると、キメラ受容体は、レポーター遺伝子ベクターのGAL4結合部位に結合し、レポーター遺伝子の発現を刺激する。化学発光シグナルの強度に従って、TR 受容体に対する化合物のアゴニスト活性を求めた。

10

【0128】

実験材料および装置

Envision2104マイクロプレートリーダー
HEK293T細胞株 (ATCCから市販) (Art.No.:CRL-3216)
pGL4.35 [Luc2P/9XGAL4 UAS/Hygro] (Promegaから市販) (Art.No.:E1370)
pBIND-TR プラスミド (Pharmaronから)
pBIND-RXR プラスミド (Pharmaronから)
LipoLTXトランスフェクション剤 (ThermoFisherから市販) (Art.No.:15338-100)
Steady-Glo (商標) ルシフェラーゼ検出キット (Promegaから市販) (Art.No.:E2520)

20

【0129】

2.3 実験化合物の調製

試験するすべての化合物を、10mmolの初期濃度から開始して、ジメチルスルホキシドにより3倍勾配で10個の希釈勾配に希釈した。

ポジティブコントロールのトリヨードサイロニン (T3) を、16.67μmolの初期濃度から開始して、ジメチルスルホキシドにより3倍勾配で10個の希釈勾配に希釈した。

30

166.7倍のポジティブコントロール (16.67μmol、トリヨードサイロニン (T3)) および166.7倍のネガティブコントロール (100%ジメチルスルホキシド) を調製した。

化合物のプレートを開けて、5分間振とうした。

【0130】

実験プロセス

3.1 細胞懸濁液の調製およびプレート播種

a) すべての細胞をATCC標準操作に従って培養し、HEK293Tを指数増殖期に試験した。

b) 培地を廃棄した。

40

c) 細胞をリン酸緩衝液で2回洗浄した。

d) トリプシン処理溶液を加えて細胞を処理し、完全培地で処理を停止した。

e) 細胞を収集してカウントし、細胞の生存率が90%を超えた場合にのみ実験を実施できた。

f) 2.5×10^6 個のHEK293-LUC細胞を60mmの細胞培養皿に播種した。

g) 細胞を播種した培養皿を、37、5%CO₂のインキュベーターに入れ、一晚培養した。

3.2 細胞トランスフェクション

a) LipoLTXトランスフェクション剤を平衡化のために室温に置いた。

b) 6μlのPlus剤および6μgのDNAを、250μlのOpti-MEM (商

50

標)培地にチューブ壁に接触させずに加え、ピペッティングガンによるブローとピペッティングにより均一に混合した。プラスミド：2.5 μgのpBIND-TR、2.5 μgのpBIND-RXR、および1 μgのpGL4.35プラスミド

c) 12 μlのLipolTXおよび250 μlのOpti-MEM(商標)培地をチューブの壁に接触させずに加え、ピペッティングガンによるブローとピペッティングにより均一に混合した。

d) DNA plus(ステップ3.2.b参照)と混合した薬剤を、希釈したLipolTX(ステップ3.2.c参照)トランスフェクション剤に添加し、室温で15分間静置した。

e) DNAと混合したトランスフェクション剤を60 mmの細胞培養皿(ステップ3.1参照)に加えた。 10

f) 培養皿を、37、5%CO₂のインキュベーターに入れ、5時間培養した。

3.3 化合物の処理

a) 150 nLの希釈化合物(ステップ2.3参照)をEcho550によって細胞培養プレート(6007680-50、PE)に移した。

b) 細胞(ステップ3.2参照)を384細胞培養プレート(6007680-50、PE)に、1ウェルあたり15,000個の細胞および25 μlの培地となるように、播種した。

c) 細胞を37、5%CO₂のインキュベーターで一晩培養した。

3.4 化合物の検出 20

a) Steady-Glo(商標)検出剤を室温に置いた。

b) 384細胞プレート(ステップ3.3参照)を室温に置いた。

c) 1ウェルあたり25 μlのSteady-Glo(商標)検出剤を細胞培養プレート(ステップ3.4b参照)に添加した。

d) プレートを振とう機に置き、光から保護しながら5分間振とうした。

e) 化学発光値をEnvision2104マイクロプレートリーダーで検出した。

【0131】

データ分析

4.1 活性(%)の計算 30

【数4】

$$\text{活性(\%)} = \left[\frac{\overline{\text{RLU}}_{\text{化合物}} - \overline{\text{RLU}}_{\text{ブランク}}}{\overline{\text{RLU}}_{\text{ポジティブ}} - \overline{\text{RLU}}_{\text{ブランク}}} \right] \times 100$$

RLU：発生した蛍光

$\overline{\text{RLU}}_{\text{化合物}}$ ：実施形態の化合物のウェル平均

$\overline{\text{RLU}}_{\text{ポジティブ}}$ ：ポジティブコントロールの平均

$\overline{\text{RLU}}_{\text{ブランク}}$ ：ネガティブコントロールの平均 40

4.2 EC50計算、および化合物の用量-効果の曲線のプロット

化合物のEC50は、Graphpad5.0を使用して計算し、化合物の活性(%)および対数濃度に適合させた。

$$Y = \text{最小} + (\text{最大} - \text{最小}) / (1 + 10^{((\text{Log IC50} - X) \times \text{傾き})})$$

X：化合物の対数濃度、Y：阻害率(パーセント)

【0132】

表2：サイロキシン受容体ベータに対する本発明の化合物のアゴニスト活性を、下記に示す。 50

【表 2】

実施形態	EC ₅₀	
	THRβ アゴニスト活性 (μM)	THRα アゴニスト活性 (μM)
実施形態 4	2.45	4.25
実施形態 9	1.75	3.98
実施形態 12	0.79	1.08
実施形態 13	0.097	0.123
比較化合物 53	2.48	4.57
T3	0.001	0.0005

10

【 0 1 3 3 】

結論

本発明の化合物は、甲状腺ホルモン受容体ベータの下流シグナルを活性化し得る。

【 0 1 3 4 】

試験 5：薬物動態学的評価

ラットを試験動物として使用した。実施形態 4 および実施形態 9 の化合物を胃内注入した後、異なる時間でのラットの血漿中の薬物濃度を調べた。ラットにおける本発明の化合物の薬物動態学的挙動を試験し、その薬物代謝特性を評価した。実施形態の各群において、同様の体重を有する 3 匹の雄 SD ラットを選択し、経口用量は、単回用量で 2 mg / kg とした。動物に該用量を投与してから、15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、10 時間、および 24 時間の時点で採血した。LC-MS/MS 分析法を用いて、血漿中の化合物の含有量を検出したが、この方法の定量の下限は 20 ng / ml であった。メタキネティックデータ分析ソフトウェア WinNonlin 7.0 を使用して、VT088 および血漿の濃度データに関する統計を作成した。特に下記の表 2 に示すように、ノンコンパートメントモデル法 (NCA) を用いて、薬物動態パラメーターを計算した。

20

30

【 0 1 3 5 】

実験スキーム

実験薬物：実施形態 4 および実施形態 9 の化合物。

実験動物

Shanghai Sippr-Bk Laboratory Animal Co., Ltd. から、動物生産ライセンス番号：SCXK (Shanghai) 2008-0016 で市販されている、6 匹の健康な雄 SD ラットを、各群 3 匹で、2 つの群に分けた。

薬物調製

一定量の薬物を採取し、2% Klucel LF + 0.1% Tween 80 水溶液に添加して、透明な溶液または均一な懸濁液を調製した。

40

投薬

SD ラットを一晩絶食させ、そして、それぞれ、2 mg / kg の投与用量および 10 mL / kg の投与体積で胃内注入によって薬物を与えた。

手法

実施形態 4 および実施形態 9 の化合物を胃内注入によりラットに投与した。少なくとも 0.2 mL の血液を、投与の前後の 15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、10 時間、および 24 時間で、尾静脈から収集し、次いで、血液をヘパリン処理したサンプルチューブに入れ、4、3500 rpm で 10 分間、遠心分離して、血漿を分離した。次に、ヘパリン処理したサンプルチューブを -20 で保存し、投与の 2 時間後にラットに餌を摂取させた。

50

種々の濃度の薬物の胃内注入後のラットの血漿中で試験された化合物含有量の測定

血漿サンプルを室温で解凍し、それぞれ50 µLを採取し、130 µLの内部標準溶液(1000 ng/mL、アセトニトリル、トルブタミド)に加え、混合物を約1分間攪拌し、次に、4、13000 rpmで10分間、遠心分離した。上澄み液50 µLを採取し、100 µLの50%アセトニトリル水と混合した後、LC/MS/MS分析にかけた。
【0136】

表3に、薬物動態パラメーターの結果を示す。

表3：ラットの医薬代謝データ

【表3】

化合物	用量 (mg/kg)	ピーク時間 (h)	ピークの血 中薬物濃度 (ng/mL)	曲線面積 (ng·h/mL)	半減期 (h)
実施形態4	2.0	5.33±1.15	727±183	9242±1245	5.14±0.83
実施形態9	2.0	4.67±1.15	2007±106	24790±3704	4.56±0.42
比較化合物53	2.0	5.3±1.15	1163±97.1	12854 ±961	3.53±0.42

10

【0137】

結論

本発明の化合物は、良好な薬物動態学的吸収および有意な薬物動態学的利点を有する。報告された比較化合物53と比較して、本発明の化合物のいくつかは、同じ用量および製剤で予想以上に高いCmax値および曝露量を示す。上記のPKの結果はすべて、本発明で提供される化合物が良好なPK特性を有し、代謝関連疾患の治療薬として使用できることを示している。

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

		F I		
A 6 1 P	5/14 (2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	

ウィート100

(72)発明者

リィ, ベン

アメリカ合衆国94404カリフォルニア州フォスター・シティ、イースト・ヒルズデイル・ブルバード1065、スウィート100

審査官 三木 寛

(56)参考文献

特表2021-531325(JP, A)

特表2009-501759(JP, A)

国際公開第2018/075650(WO, A1)

特開平02-225483(JP, A)

中国特許出願公開第102898377(CN, A)

特表2004-517851(JP, A)

国際公開第2003/064369(WO, A1)

Kelly, Martha J. et al, Discovery of 2-[3,5-Dichloro-4-(5-isopropyl-6-oxo-1,6-dihydropyridazin-3-yloxy)phenyl]-3,5-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro[1,2,4]triazine-6-carbonitrile (MGL-3196), a Highly Selective Thyroid Hormone Receptor Agonist in Clinical Trials for the Treatment of Dyslipidemia, Journal of Medicinal Chemistry, 2014年, Vol.57(10), p.3912-3923

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 D 4 0 3 / 1 2

A 6 1 K 3 1 / 5 3

A 6 1 P 3 / 0 4

A 6 1 P 3 / 0 6

A 6 1 P 3 / 1 0

A 6 1 P 5 / 1 4

A 6 1 P 9 / 1 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)